

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

E.A.P. DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

**“Estandarización y validación del método HET-CAM
para medir la irritabilidad ocular *in vitro* de los
extractos de cinco frutos nativos del Perú utilizados en
la industria cosmética”**

TESIS

Tesis para optar el Título Profesional de Químico-Farmacéutico

AUTOR

Evelyn del Rosario Taype Espinoza

ASESOR

Dr. Pablo Enrique Bonilla Rivera

Lima-Perú

2015

DEDICATORIA

A DIOS, por haberme permitido estar presente para la obtención de este preciado y esforzado logro profesional.

A mi madre ELVA por todo el amor que me brindo, porque siempre estuvo conmigo, por cuidarme siempre y porque su recuerdo es mi motivación y guía para ser una mejor persona cada día.

A mi padre DEMETRIO y a mi hermano HEBERT, por su apoyo incondicional y permanente aliento para terminar esta etapa de mi vida profesional.

A mi abuelita HERMELINDA por sus abrazos interminables, porque estuvo conmigo en los momentos que más lo necesite.

A mi familia, en especial a mis tías HORTENCIA y MARGARITA, por el apoyo y cariño de siempre.

A SYLVANA, JULY, MIGUEL y JAVIER, por su amistad, sus consejos y motivación constante durante el desarrollo de esta investigación.

Bachiller EVELYNG DEL ROSARIO TAYPE ESPINOZA

AGRADECIMIENTOS

El agradecimiento sincero a los distinguidos miembros del Jurado Examinador y Calificador del presente trabajo de investigación, conformado por:

Presidente: MG. RAÚL MÁXIMO SORIA LÓPEZ

**Miembros: Q.F. BERTHA JURADO TEIXEIRA
MG. FRANCISCO JAVIER RAMÍREZ CRUZ
Q.F. MÓNICA GUADALUPE RETUERTO FIGUEROA**

Por sus notables conocimientos y valiosos aportes brindados para la elaboración y culminación del presente trabajo.

A mi asesor DR. PABLO ENRIQUE BONILLA RIVERA y co-asesor MG. MIGUEL ÁNGEL INOCENTE CAMONES, por su apoyo incondicional, por brindarme sus comentarios, sugerencias y continuo apoyo a lo largo de la realización del presente trabajo.

A los miembros del laboratorio de Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres y las instalaciones de la empresa privada Ingenioidea SAC, en especial a la BIOL. EMILY TOSCANO, quienes colaboran con la presente investigación y por los gratos momentos compartidos en el laboratorio.

A las empresas Latinoamericana de Ciencias S.A.C. y Mácula D&T, en especial al DR. EDMUNDO STAHL y a la SRA. CARMELA ROCA, por el apoyo y las facilidades brindadas para poder desarrollar el presente trabajo de investigación.

A la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos y a cada uno de sus miembros, que de una u otra manera contribuyeron en la realización de este trabajo.

"Nunca dejes que nadie te diga que no puedes hacer algo. Ni siquiera yo. Si tienes un sueño tienes que protegerlo. Las personas que no son capaces de hacer algo te dirán que tú tampoco puedes, pero si tienes un sueño, persíguelo, y punto."

En busca de la Felicidad

ÍNDICE

RESUMEN	9
SUMMARY	10
Abreviaturas	11
Lista de Anexos	13
Lista de Tablas	14
Lista de Gráficos	16
Lista de Figuras	17
I. INTRODUCCIÓN	18
1.1 Objetivo general	20
1.2 Objetivos secundarios	20
1.3 Hipótesis	20
II. GENERALIDADES	21
2.1 Pruebas utilizadas para la evaluación de la irritabilidad de productos cosméticos	21
2.1.1 Ensayos <i>in vivo</i> (Test de Draize)	21
2.1.2 Ensayos alternativos	21
2.1.2.1 Ensayos alternativos basados en metodología con órganos aislados	22
a. Ensayo de permeabilidad y opacidad de la córnea bovina (BCOP)	23
2.1.2.2 Ensayos alternativos basados en metodología en sistemas de cultivo celular y tisular	23
a. Modelos basados en tejidos humanos reconstituidos	23
b. Ensayos de citotoxicidad	24
- Ensayo de hemólisis (RBC)	24
c. Ensayos alternativos basados en características funcionales de las células	25
2.1.2.3 Métodos basados en propiedades fisicoquímicas	25
2.1.2.4 Ensayos de Irritabilidad ocular <i>in vitro</i>	26

a. Ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina (HET-CAM)	26
b. Ensayo de irritabilidad en membrana corioalantoidea vascular (CAMVA)	27
c. Ensayo de la irritación de la membrana corioalantoidea mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS)	28
2.1.2.5 Ventajas y desventajas de los ensayos CAM	29
2.1.2.6 Regulaciones normativas relacionadas con los ensayos alternativos	32
2.2 Caracteres y uso cosmético de los frutos nativos del Perú	35
2.2.1 <i>Mauritia flexuosa</i> L. (aguaje)	35
2.2.2 <i>Myrciaria dubia</i> L. (camu camu)	37
2.2.3 <i>Solanum sessiliflorum</i> D. (cocona)	39
2.2.4 <i>Physalis peruviana</i> L. (aguaymanto)	40
2.2.5 <i>Passiflora mollissima</i> HBK (tumbo serrano)	42
2.3 Conceptos teóricos sobre los excipientes en formulaciones cosméticas	43
2.3.1 Utilización de polietilenglicoles para formulaciones cosméticas	43
2.3.2 Estudios de irritabilidad ocular de los polietilenglicoles en formulaciones	44
2.4 Conceptos teóricos sobre estandarización y validación de una técnica analítica	45
2.4.1 Estandarización	45
2.4.2 Validación	45
2.4.2.1 Linealidad y Rango	46
a. Procedimiento de determinación de la linealidad	46
b. Evaluación estadística de la linealidad	47
- Ecuación de la recta	47
- Coeficiente de correlación	47
c. Límite de Cuantificación	47
2.4.2.2 Precisión	48
a. Repetibilidad	48

b. Reproducibilidad	48
2.4.2.3 Robustez	48
2.4.2.4 Exactitud	49
a. Porcentaje de recuperación	49
2.4.3 Estandarización y validación del método HET-CAM	49
2.4.4 Método HET-CAM como parámetro de inocuidad en la industria cosmética	51
III. PARTE EXPERIMENTAL	52
3.1 Materiales y métodos	52
3.1.1 Tipo de estudio	52
3.1.2 Equipos	52
3.1.3 Materiales	52
3.1.4 Reactivos y solventes	52
3.1.5 Representación gráfica del estudio	53
3.1.6 Obtención de las muestras	54
3.1.7 Elaboración de extractos	54
3.1.8 Tratamientos previos a la obtención de los extractos	54
3.1.8.1 Selección de la fruta	54
3.1.8.2 Lavado de la fruta	55
3.1.8.3 Pesado de la fruta	55
3.1.8.4 Pelado de la fruta	55
3.1.8.5 Tratamiento adicional para la fruta	55
3.1.9 Elaboración de los extractos acuosos	56
3.1.10 Elaboración de los extractos hidroalcohólicos	57
3.1.11 Elaboración del extracto glicólico	57
3.2 Evaluación de la irritabilidad ocular de los extractos	57
3.2.1 Estandarización del método HET-CAM	57
3.2.2 Método HET-CAM	57
3.2.3 Método de la membrana corioalantoidea mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS)	61
3.2.4 Validación del Método de la membrana corioalantoidea	

mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS)	62
3.2.4.1 Linealidad	62
3.2.4.2 Precisión	62
a. Repetibilidad	63
b. Reproducibilidad	63
3.2.4.3 Robustez	63
3.2.4.4 Exactitud	63
IV. RESULTADOS	64
4.1 Método HET-CAM	64
4.2 Método de la membrana corioalantoidea mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS)	69
4.3 Validación del método de la membrana corioalantoidea mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS)	71
4.3.1 Linealidad	71
4.3.2 Precisión	74
4.3.2.1 Repetibilidad	74
4.3.2.2 Reproducibilidad	76
4.3.3 Robustez	77
4.3.4 Exactitud	79
V. DISCUSIÓN	82
VI. CONCLUSIONES	84
VII. RECOMENDACIONES	85
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
ANEXOS	97

RESUMEN

La presente investigación, provee datos científicos sobre los métodos HET-CAM cualitativo y HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS), evaluado en frutos nativos, lo cual puede ser desarrollado profundamente como un método alternativo a la prueba de Draize. El objetivo es estandarizar y validar el método HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) en cinco extractos de frutos nativos del Perú. Los frutos evaluados fueron *Physalis peruviana* L. (aguaymanto), *Myrciaria dubia* L. (camu camu), *Mauritia flexuosa* L. (aguaje), *Solanum sessiliflorum* D. (cocona) y *Passiflora mollisima* HBK (tumbo serrano). Estas frutas listadas son comúnmente utilizadas en formulaciones cosméticas. Se prepararon extractos acuosos, hidroalcohólicos y glicólicos. La implementación de la técnica, estandarización y validación, se realizó en el laboratorio de Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres (USMP) y en las instalaciones de la empresa privada Ingenioidea SAC, ambas instituciones están localizadas en Lima, Perú. Para la validación del método HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) se evaluaron los parámetros: Linealidad, precisión, exactitud y robustez. Los resultados de estos parámetros se sometieron a pruebas estadísticas demostrando que el método HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) propuesto para la medición de la irritabilidad ocular *in vitro* es lineal, exacto y preciso pero no robusto.

Palabras clave: prueba de irritabilidad ocular, *Physalis peruviana* L. (aguaymanto), *Myrciaria dubia* L. (camu camu), *Mauritia flexuosa* L. (aguaje), *Solanum sessiliflorum* D. (cocona) y *Passiflora mollisima* HBK (tumbo serrano), HET-CAM, CAM-TBS, validación

ABSTRACT

This investigation provides scientific data on qualitative HET-CAM and (CAM-TBS) quantitative HET-CAM methods, in which native fruits has been evaluated. Furthermore, this investigation would allow to be developed as an alternative method to the Draize Test. The principal objective is standardize and validate the (CAM-TBS) quantitative HET-CAM method in five Peruvian native fruits. The fruits *Physalis peruviana* L. (aguaymanto), *Myrciaria dubia* L. (camu camu), *Mauritia flexuosa* L. (aguaje), *Solanum sessiliflorum* D. (cocona) and *Passiflora mollissima* HBK (tumbo serrano) were evaluated. These fruits listed are commonly used in cosmetic formulations. Aqueous, hydro alcoholic and glycolic preparations were performed. The implementation of standardization and validation technique was performed in collaborating with a laboratory of Investigation Center of Biochemistry and Nutrition of Faculty of Human Medicine in Universidad de San Martín de Porres (USMP) and Ingenioidea SAC private company, both institutions are located in Lima, Peru. For the validation of the (CAM-TBS) quantitative HET-CAM method, the parameters were evaluated: Linearity, precision, accuracy and robustness. The results of these parameters were evaluated by statistical tests demonstrating that quantitative HET-CAM (CAM-TBS) method proposed for measuring ocular irritability *in vitro* is lineal, accurate and precise but is not robust.

Key words: eye irritation test, *Physalis peruviana* L. (aguaymanto), *Myrciaria dubia* L. (camu camu), *Mauritia flexuosa* L. (aguaje), *Solanum sessiliflorum* D. (cocona) y *Passiflora mollissima* HBK (tumbo serrano), HET-CAM, CAM-TBS, validation

ABREVIATURAS

OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide</i>
LDH	Lactato deshidrogenasa
TEP	Permeabilidad transepitelial
TER	Resistencia eléctrica transepitelial
BCOP	Ensayo de permeabilidad y opacidad de la córnea bovina
IRE	Ensayo del ojo aislado de conejo (IRE)
ICE	Ensayo del ojo aislado de pollo
CM	Ensayo microfisiómetro citosensor
SM	Microfisiómetro de silicio
NRU	Ensayo de captación del colorante rojo neutro
NRR	Ensayo de liberación del colorante rojo neutro
RBC	Ensayo de hemólisis
QSAR	Relación actividad-estructura cuantitativa
FL	Valoración de la integridad epitelial mediante fluoresceína
FDA	Agencia de Drogas y Alimentos
EPA	Agencia de Protección Ambiental de Estados
ESAC	Comité Científico Asesor del ECVAM
INVITTOX	Técnicas <i>in vitro</i> en Toxicología
CA	Colorante absorbido
II	Índice de irritación
HET-CAM	Ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina
CAMVA	Ensayo de irritabilidad en membrana corioalantoidea vascular
CAM-TBS	Ensayo de la irritación de la membrana corioalantoidea mediante tinción con azul de tripán
COLIPA	Asociación Europea de Cosméticos
CTFA	Asociación de Cosméticos, Artículos de Tocador y Fragancias
IRAG	Grupo alternativo regulatorio inter-agencias de EE.UU.
ECVAM	Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos

PEG	Polyethylene glycol
NICEATM	Centro Inter-agencias para la Evaluación de Métodos Toxicológicos Alternativos de la NTP
NTP	Programa toxicológico Nacional EEUU
ICCVAM	Comité Coordinador de Inter-agencias para la Validación de Métodos Alternativos
Ho	Hipótesis nula
H1	Hipótesis alternativa
P	Probabilidad de error
R	Coeficiente de correlación
CV	Coeficiente de variación
RSD	Desviación estándar relativa
DS	Desviación estándar
CA	Colorante absorbido
ABS	Absorbancia
GL	Grados de libertad
N	Número de muestra

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Certificado botánico de <i>Physalis peruviana</i> L.	97
Anexo 2. Certificado botánico de <i>Myrciaria dubia</i> L.	98
Anexo 3. Certificado botánico de <i>Mauritia flexuosa</i> L.	99
Anexo 4. Certificado botánico de <i>Solanum sessiliflorum</i> D.	100
Anexo 5. Certificado botánico de <i>Passiflora mollissima</i> HBK	101
Anexo 6. Resultados del método CAM-TBS. Incluye las tablas 15-19	102
Anexo 7. Resultados de la Repetibilidad del método CAM-TBS. Incluye las tablas 20-24	105
Anexo 8. Resultados de la Reproducibilidad del método CAM-TBS. Incluye la tabla 25	110
Anexo 9. Resultados de la Robustez del método CAM-TBS. Incluye la tabla 26	111
Anexo 10. Resultados de la Exactitud del método CAM-TBS. Incluye las tablas 27-37	112

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Métodos de la prueba de irritabilidad ocular <i>in vitro</i> .	34
Tabla 2. Clasificación para determinar la irritabilidad del producto, mediante método HET-CAM.	58
Tabla 3. Clasificación para determinar la irritabilidad del producto, mediante el método HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS).	62
Tabla 4. Resultados del método HET-CAM de los controles del estudio.	64
Tabla 5. Resultados del método HET-CAM de los extractos.	65
Tabla 6. Curva de calibración del colorante azul de tripán en formamida.	69
Tabla 7. Resultados del método HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) de los controles del estudio.	69
Tabla 8. Resultados del método HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) de los extractos.	70
Tabla 9. Linealidad del control lauril sulfato de sodio (LSS).	72
Tabla 10. Linealidad para el control hidróxido de sodio (NaOH).	73
Tabla 11. Test de Levene para evaluar la homogeneidad de varianza para los extractos acuosos.	75
Tabla 12. Evaluación de la reproducibilidad, según parámetro de analista, en un sólo día de análisis.	76
Tabla 13. Evaluación de la robustez, según parámetro de lugar de análisis, en un sólo día de análisis.	78
Tabla 14. Evaluación de la exactitud, mediante el porcentaje de recuperación y la correlación de Pearson.	80
Tabla 15. Datos del método HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) para los extractos de aguaymanto.	102
Tabla 16. Datos del método HET-CAM modificado (CAM-TBS) para los extractos de camu camu.	102
Tabla 17. Datos del método HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) para los extractos de aguaje.	103
Tabla 18. Datos del método HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) para los	103

extractos de cocona.

Tabla 19. Datos del método HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) para los extractos de tumbo serrano.	104
Tabla 20. Repetibilidad del extracto acuoso de aguaymanto	105
Tabla 21. Repetibilidad del extracto acuoso de camu camu	106
Tabla 22. Repetibilidad del extracto acuoso de aguaje	107
Tabla 23. Repetibilidad del extracto acuoso de cocona	108
Tabla 24. Repetibilidad del extracto acuoso de tumbo serrano	109
Tabla 25. Reproducibilidad de los extractos (CA (nmoles/mg))	110
Tabla 26. Robustez de los extractos (CA (nmoles/mg))	111
Tabla 27. Exactitud por el método de adición de patrón (hidróxido de sodio).	112
Tabla 28. Exactitud del extracto acuoso de aguaymanto por el método de adición de patrón (hidróxido de sodio).	113
Tabla 29. Cálculo del porcentaje de recuperación del extracto acuoso de aguaymanto por el método de adición de patrón (hidróxido de sodio).	113
Tabla 30. Exactitud del extracto acuoso de camu camu por el método de adición de patrón (hidróxido de sodio).	114
Tabla 31. Cálculo del porcentaje de recuperación del extracto acuoso de camu camu por el método de adición de patrón (hidróxido de sodio).	114
Tabla 32. Exactitud del extracto acuoso de aguaje por el método de adición de patrón (hidróxido de sodio).	115
Tabla 33. Cálculo del porcentaje de recuperación del extracto acuoso de aguaje por el método de adición de patrón (hidróxido de sodio)	115
Tabla 34. Exactitud del extracto acuoso de cocona por el método de adición de patrón (hidróxido de sodio).	116
Tabla 35. Cálculo del porcentaje de recuperación del extracto acuoso de cocona por el método de adición de patrón (hidróxido de sodio).	116
Tabla 36. Exactitud del extracto acuoso de tumbo serrano por el método de adición de patrón (hidróxido de sodio).	117
Tabla 37. Cálculo del porcentaje de recuperación del extracto acuoso de tumbo serrano por el método de adición de patrón (hidróxido de sodio).	117

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Metodología de los métodos <i>in vitro</i> basados en CAM	53
Gráfico 2. Curva de calibración del colorante azul de tripán en formamida	69
Gráfico 3. Linealidad para el lauril sulfato	72
Gráfico 4. Linealidad para el hidróxido de sodio	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Planta de <i>Mauritia flexuosa</i> L.	33
Figura 2. Fruto de <i>Mauritia flexuosa</i> L.	33
Figura 3. Planta de <i>Myrciaria dubia</i> L.	35
Figura 4. Fruto de <i>Myrciaria dubia</i> L.	35
Figura 5. Planta de <i>Solanum sessiliflorum</i> D.	36
Figura 6. Fruto de <i>Solanum sessiliflorum</i> D.	37
Figura 7. Fruto de <i>Physalis peruviana</i> L.	38
Figura 8. Fruto de <i>Physalis peruviana</i> L.	38
Figura 9. Fruto de <i>Physalis peruviana</i> L.	39
Figura 10. Fruto de <i>Physalis peruviana</i> L.	40
Figura 11. Incubadora artesanal (interior)	56
Figura 12. Incubadora artesanal (lateral)	56
Figura 13. Incubadora artesanal (frontal)	56
Figura 14. Limpieza y enumeración de los huevos a analizar.	57
Figura 15. Preparación de la CAM de los huevos a analizar.	57
Figura 16. Evaluación del efecto del lauril sulfato de sodio 1%, en la CAM.	63
Figura 17. Evaluación del efecto del hidróxido de sodio 0,1 N en la CAM.	64
Figura 18. Evaluación del efecto del extracto glicólico de aguaymanto en la CAM.	64
Figura 19. Evaluación del efecto del extracto glicólico de camu camu en la CAM.	64
Figura 20. Evaluación del efecto del extracto glicólico de aguaje en la CAM.	65
Figura 21. Evaluación del efecto del extracto hidroalcohólico de cocona en la CAM.	65
Figura 22. Evaluación del efecto del extracto hidroalcohólico de tumbo serrano en la CAM.	65

I. INTRODUCCIÓN

La evaluación de la irritabilidad ocular *in vivo* según el método de Draize requiere la aplicación de la sustancia de ensayo en la conjuntiva del animal de experimentación (conejos), sometiéndolo en muchos casos al dolor, ulceración y hasta necrosis de las estructuras oculares. Aunque últimamente se ha aceptado la disminución del número de animales en esta prueba, aún constituye un ensayo cruento y rechazado por muchos investigadores que observan en los métodos *in vitro* una alternativa útil no sólo para evitar la exposición innecesaria de los animales a productos potencialmente tóxicos sino que además logran una mayor correlación de los resultados obtenidos en pruebas clínicas comprobadas con los ensayos en animales. Actualmente numerosos laboratorios en el mundo han incorporado el método con la membrana corioalantoidea del huevo de gallina (HET-CAM, *hen's egg test chorioallantoic membrane* por sus siglas en inglés) para la evaluación de la irritación ocular producida por cosméticos; debido a su rapidez, simplicidad, sensibilidad, fácil ejecución y su relativo bajo costo [1].

La industria y algunas agencias regulatorias están buscando alternativas a la prueba de irritación ocular de Draize en conejos para abordar las tres R's de Russell y Burch; Reducción, Refinamiento y Reemplazo, todo lo cual ha motivado que exista una corriente de opinión para el fomento y desarrollo científico de métodos que contribuyan a disminuir la utilización de animales en las pruebas toxicológicas y de control de sustancias [2].

Décadas de investigación y validación han producido las pruebas de toxicidad ocular no basada en animales, estas son las pruebas basadas en la membrana corioalantoidea del embrión de pollo (CAM, *Chorioallantoid Membrane* por sus siglas en inglés), este método se ha utilizado con éxito como una alternativa a la prueba de Draize que consiste en aplicar los productos en ojo de conejos.

Por lo tanto el objetivo de este estudio es estandarizar y validar la prueba de irritabilidad ocular *in vitro*, mediante el método HET-CAM cuantitativo de la irritación de la membrana corioalantoidea mediante tinción con azul de Tripán (CAM-TBS, *Chorioallantoic Membrane-Trypan Blue Staining* por sus siglas en inglés). La tendencia europea para obtener productos cosméticos con ingredientes no irritantes, se ha convertido en una influencia mundial; por lo cual, se busca que los ingredientes dentro de la fórmula sean de origen natural y no irritantes para el ser humano. Debido a esta tendencia, la industria cosmética se encuentra en la búsqueda de ingredientes de origen vegetal para incorporarlos en sus formulaciones; sin embargo son escasos estudios realizados con extractos de frutos nativos, a nivel de seguridad y eficacia de los productos cosméticos [1].

1.1 Objetivo General

- Estandarizar y validar la prueba de irritabilidad ocular *in vitro*, mediante los métodos HET-CAM cualitativo y HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS), en los extractos de *Physalis peruviana* L. (aguaymanto), *Myrciaria dubia* L. (camu camu), *Mauritia flexuosa* L. (aguaje), *Solanum sessiliflorum* D. (cocona) y *Passiflora mollissima* HBK (tumbo serrano).

1.2 Objetivos Secundarios

- Elaboración del extracto acuoso, glicólico y etanólico de *Physalis peruviana* L. (aguaymanto), *Myrciaria dubia* L. (camu camu), *Mauritia flexuosa* L. (aguaje), *Solanum sessiliflorum* D. (cocona) y *Passiflora mollissima* HBK (tumbo serrano).
- Estandarización de la prueba de irritabilidad ocular *in vitro*, utilizando el método HET-CAM cualitativo y cuantitativo.
- Validación del método HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) para los extractos de *Physalis peruviana* L. (aguaymanto), *Myrciaria dubia* L. (camu camu), *Mauritia flexuosa* L. (aguaje), *Solanum sessiliflorum* D. (cocona) y *Passiflora mollissima* HBK (tumbo serrano).
- Análisis de la robustez a nivel de inter-laboratorios con la técnica HET-CAM cualitativo y HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS).

1.3 Hipótesis

- La estandarización y la validación de la prueba de irritabilidad ocular *in vitro*, evaluados según los métodos HET-CAM cualitativo y HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS), cumplen con los parámetros establecidos para cada evaluación.

II. GENERALIDADES

2.1 Pruebas utilizadas para la evaluación de la irritabilidad de productos cosméticos

2.1.1 Ensayos *in vivo* (Test de Draize)

El ensayo para la predicción de los efectos irritantes de los cosméticos, medicamentos y sustancias químicas sobre las membranas mucosas y la piel fue desarrollado por Draize en el año 1944 [3].

Este ensayo permite evaluar los efectos a nivel ocular que aparecen por la exposición aguda de las sustancias a analizar sobre la mucosa ocular del conejo, mediante la observación de las reacciones que ocurren a nivel de córnea, iris y conjuntiva, y de acuerdo con el sistema de Draize para evaluar la severidad de las lesiones oculares producidas, es posible clasificar los compuestos en cuanto a su potencial irritante. Los resultados de este ensayo han sido usados durante años para la clasificación de diferentes compuestos y han constituido la base de la Norma N° 405 adoptada por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE, *The Organisation for Economic Cooperation and Development* por sus siglas en inglés) en el año 1981 y de la norma ISO/DIC-10 993 No.10 adoptada en el año 1992 para la conducción de los ensayos de irritabilidad ocular [4, 5].

2.1.2 Ensayos alternativos

Actualmente se sigue trabajando en la búsqueda de métodos alternativos y en la mejora de aquellos métodos que se han mostrado eficaces para realizar tamizajes iniciales de los productos.

La sostenibilidad de los ensayos alternativos es mucho más amplia que la sustitución del uso de animales, incluyendo también la necesidad de la reducción y refinación. Este principio se basa en el concepto de las 3 R's

(*Three R's, Refine, Reduction y Replacement*, por sus siglas en inglés), definido por William Russell y Rex Burch, en el año 1959 tienen como estrategia la investigación preclínica minimizando el uso de animales, y minimizando el sufrimiento, sin comprometer la calidad del trabajo científico que se está ejecutando, visualizando en el futuro, la total sustitución de animales por métodos experimentales alternativos [2], los cuales son:

- a) Incorpora un **refinamiento** de los procedimientos, de modo que disminuyen el dolor o malestar de los animales, o bien aumentan su bienestar.
- b) Permite una **reducción** en el número de animales utilizados.
- c) Facilita el **reemplazo** del uso de animales por sistemas que no requieren seres vivos, o emplean otras especies animales que sean inferiores en la escala filogenética animal.

Los métodos alternativos para valorar la irritación ocular que se ha propuesto para sustituir a los ensayos de Draize se clasifican en modelos basados en órganos aislados, sistemas de cultivo celular o tisular, métodos basados en propiedades fisicoquímicas e *in vitro* de los productos a evaluar.

2.1.2.1 Ensayos alternativos basados en metodología con órganos aislados

Estos métodos se basan en la utilización de ojos o córneas procedentes de diversos animales (bovinos, porcinos, conejos o pollos), los cuales se exponen a los productos irritantes. Entre estos métodos se encuentra el ensayo de permeabilidad y opacidad de la córnea bovina (BCOP, *Bovine Corneal Opacity and Permeability* por sus siglas en inglés) [6], que se realiza en las córneas aisladas de bueyes o vacas procedentes de mataderos. También existen otros ensayos que utilizan el globo ocular completo de distintos animales: ensayo de irritabilidad en ojo aislado de conejo (IRE, *Isolated Rabbit Eye* por sus siglas en inglés) [7], y el ensayo en el ojo aislado de pollo (ICE, *Isolated Chicken Eye* por sus siglas en inglés) [7, 8, 9]. En los dos últimos ensayos, una vez expuesto el ojo a la sustancia ensayada se examina la córnea para detectar posibles

cambios como edema, opacidad y retención de fluoresceína en el epitelio.

a. Ensayo de permeabilidad y opacidad de la córnea bovina (BCOP)

El ensayo se basa en la medida de la opacidad y de la permeabilidad de la córnea del becerro tras el contacto con el producto evaluado. La medida de la opacificación córnea se realiza con un opacitómetro (490nm), aparato que determina la diferencia de transmisión del flujo luminoso en la córnea evaluada, fijando un valor numérico de opacidad; finalmente se obtiene una escala que considera los fenómenos observados [2].

2.1.2.2 Ensayos alternativos basados en la metodología de sistemas de cultivo celular y tisular

a. Modelos basados en tejidos humanos reconstituidos

Se han desarrollado distintos modelos que intentan imitar el epitelio corneal y formar una interfase aire-líquido similar a la mucosa corneal. Entre dichos modelos se encuentran los siguientes: modelo EpiOcular TM [10], modelo de epitelio corneal reconstituido de “Skin Ethic” [11, 12] y el modelo “Gillette”.

Entre los criterios de valoración también se encuentran ensayos de viabilidad celular como el ensayo MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide assay* por sus siglas en inglés) aunque también puede utilizarse la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH, *lactate dehydrogenase* por sus siglas en inglés) así como citocinas, estudios histológicos o la expresión génica [13].

En el modelo “Gillette”, los criterios de valoración que se utilizan son la permeabilidad transepitelial (TEP, *fluorescein transepithelial permeability* por sus siglas en inglés) y la resistencia eléctrica transepitelial (TER, *transepithelial electrical resistance* por sus siglas en inglés) que valoran la integridad del epitelio corneal [13].

b. Ensayos de citotoxicidad

La utilización de ensayos de citotoxicidad para la valoración del potencial irritante ocular se basa en la observación de sustancias que lesionan la piel o las mucosas, y producen efectos citotóxicos sobre diferentes tejidos epiteliales y endoteliales. Se ha sugerido que un producto químico puede ejercer un efecto citotóxico interfiriendo en funciones celulares básicas y con estructuras comunes a todos los tejidos (citotoxicidad basal) o interfiriendo con funciones y estructuras específicas de un tejido (citotoxicidad específica de órgano).

Para valorar la citotoxicidad pueden tenerse en cuenta diferentes criterios de valoración como: morfología, viabilidad, metabolismo, integridad de la membrana celular, proliferación, adhesión y captación o incorporación de precursores radiactivos.

Entre los ensayos de citotoxicidad más utilizados encontramos el ensayo de captación del colorante rojo neutro (*NRU, Neutral Red Uptake Assay* por sus siglas en inglés) [14, 15, 16, 17]; el ensayo de liberación del colorante rojo neutro (*NRR, Neutral Red Release Assay* por sus siglas en inglés) [18, 19]; y el ensayo de hemólisis (*RBC, Red Blood Cell Haemolysis Test* por sus siglas en inglés) [20, 21, 22, 23].

- Ensayo de Hemólisis (RBC)

El ensayo de hemólisis (*RBC, Red Blood Cell System* por sus siglas en inglés) permite cuantificar y evaluar los efectos adversos de los tensoactivos utilizados en champús, jabones de tocador líquidos y productos de higiene sobre la membrana plasmática de los eritrocitos y la consecuente liberación de la hemoglobina (hemólisis) y aún, el índice de desnaturalización de la hemoglobina, evaluado por medio de su forma oxidada, ambos cuantificados por espectrofotometría. La relación entre la hemólisis y la oxidación de la hemoglobina suministra un parámetro de caracterización de los efectos de dichas sustancias *in vitro* [2].

c. Ensayos alternativos basados en características funcionales de las células

Entre los ensayos basados en determinadas características funcionales de las células se encuentran los siguientes: la valoración de la integridad epitelial mediante fluoresceína (*FL, Fluorescein Leakage Test* por sus siglas en inglés) [24, 25, 26]. Se basa en el hecho que el epitelio corneal tiene la capacidad de actuar como barrera impermeable a sustancias potencialmente peligrosas y que, por lo tanto, cuando se daña su estructura se produce irritación ocular. En este ensayo se obtiene una estructura *in vitro* similar al epitelio corneal, cultivando células epiteliales hasta que se establecen entre ellas uniones estrechas y desmosomas. Se expone la capa de células a la sustancia a ensayar y, después de retirarla, se añade una solución de fluoresceína para cuantificar qué cantidad de colorante es capaz de atravesar ese epitelio.

Con el equipo microfisiómetro citosensor (*CM, Cytosensor Microphysiometer* por sus siglas en inglés), o microfisiómetro de silicio (*SM, The Silicon Microphysiometer* por sus siglas en inglés) [27, 28, 29, 30]; se determinan los cambios en la actividad metabólica de cultivos celulares como una medida indirecta del potencial irritante.

2.1.2.3 Métodos basados en propiedades fisicoquímicas

Para valorar la irritación ocular se ha desarrollado el ensayo IRRITECTION® que es una actualización del EYTEXTM System [31]. Se basa en la utilización de un reactivo macromolecular que adopta una estructura similar a la córnea. Las sustancias irritantes cuando entran en contacto con el reactivo provocan la aparición de turbidez a causa de cambios conformacionales en la estructura macromolecular y en su nivel de hidratación.

También se han desarrollado modelos de predicción basados en la relación estructura-actividad (*QSAR, Quantitative Structure – Activity Relationship* por sus siglas en inglés) para predecir el potencial irritante de las sustancias [32, 33, 34, 35, 36, 37].

2.1.2.4 Ensayos de Irritabilidad ocular *in vitro*

El ensayo de la CAM conocido como HET-CAM es un método propuesto por Lüpke [38], modificado por Spielmann [39] y por Steiling [40] que permite estimar el potencial de irritación ocular *in vitro* de sustancias y productos terminados. Itagaki y col. [41] introdujeron una variante a esta técnica, que consiste en el uso de un colorante y la observación espectrofotométrica de la muestra, suprimiendo así el carácter subjetivo del resultado. A partir del establecimiento de estos protocolos, el método del HET-CAM como sustituto del test de Draize ha sido uno de los más utilizados [42, 43].

a. Ensayo de la membrana corioalantoidea del huevo de gallina (Método HET-CAM)

En comparación con otros modelos organotípicos, el método HET-CAM permite la identificación de las reacciones por irritación que parece ser similares a las que ocurren en el ojo usando el Test de Draize. En el sistema del método HET-CAM, se determinan tres reacciones: hemorragia, lisis y coagulación de la membrana corioalantoidea al noveno día de embrionación cuando el tejido nervioso y la percepción del dolor aún no se han desarrollado [44].

Los huevos de gallina se incuban en una incubadora durante 9 días después de cuyo tiempo los huevos defectuosos se descartan. La cáscara alrededor de la celda de aire se retira y las membranas internas se extraen para revelar la membrana corioalantoidea. Las sustancias de ensayo se añaden a la membrana y se dejan en contacto durante 5 minutos. La membrana se examina para evaluar el daño vascular y se registra el tiempo necesario para que se produzca la lesión. La irritación se obtiene de acuerdo con la gravedad y la velocidad a la que se produce el daño [39].

Después de colocar la muestra de ensayo directamente sobre la CAM, se lleva a cabo una evaluación de los parámetros mencionados anteriormente durante un periodo de observación de 5 minutos. El enfoque más ampliamente utilizado es la determinación del tiempo de reacción hasta la aparición de cada uno de

los tres puntos finales. Otro método es la determinación del umbral de irritación, que evalúa la concentración del material de ensayo en el que se observan los efectos sobre estos parámetros. Considerando que estos enfoques se utilizan principalmente para sustancias transparentes, un tercer enfoque para materiales insolubles y sólidos no transparentes puede ser utilizado mediante la exposición de la CAM para analizar muestras durante un tiempo fijo (30 segundos o 5 minutos) y el análisis de los puntos finales después de enjuagar para eliminar la muestra. Se ha encontrado que el período de exposición de 5 minutos a la sustancia de ensayo es suficiente para revelar efectos tóxicos/irritantes (la exposición más amplia no parece producir cualquier información adicional) [39].

b. Ensayo de irritabilidad en membrana corioalantoidea vascular (CAMVA)

Fue desarrollado por Leighton y colaboradores en 1985 [45]; y modificado por Bagley y colaboradores en 1989 y 1991 [46, 47].

El ensayo de irritabilidad en membrana corioalantoidea vascular (CAMVA, *The chorioallantoic membrane vascular assay* por sus siglas en inglés) evalúa los posibles efectos perjudiciales que las sustancias irritantes oculares potenciales producen en los vasos sanguíneos de la CAM del embrión. En la preparación de este ensayo se corta una pequeña abertura en la cáscara del huevo cuatro días después de la fertilización y una pequeña cantidad de albúmina se elimina para permitir el crecimiento óptimo de la CAM. La abertura se vuelve a cerrar herméticamente y los huevos se incuban durante 6 días [44]. El tiempo máximo de utilización de la CAM, en este ensayo se ha limitado a 10 días con el fin de cumplir con la legislación en los países de la Unión Europea que prohíbe los experimentos en embriones de pollo, mayores de 10 días [48, 49].

En el décimo día, la sustancia de ensayo se aplica directamente sobre una pequeña área de la CAM. Después de la exposición durante 30 minutos se examinan los cambios vasculares en la CAM, por ejemplo, hemorragia, lisis o la aparición de vasos desprovistos de flujo de sangre (vasos fantasmas). La

concentración de las sustancias en el ensayo que suscitan tales efectos perjudiciales en el 50% de los huevos, se calcula como parámetro toxicológico. Este ensayo proporciona una vasculatura funcional similar a la conjuntiva. Las sustancias activas actuarán sobre las células musculares lisas para dilatar o contraer los vasos capilares. El método CAMVA se utiliza en la industria cosmética principalmente en los EE.UU. (o contrato de laboratorios) para la detección y evaluación de la seguridad de los cosméticos. El diseño de tejidos humanos *in vitro* ha suplantado a los ensayos basados en la CAM; para las empresas [44].

c. Ensayo de la irritación de la membrana corioalantoidea mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS)

El método CAM-TBS fue desarrollado por Hagino en 1991 y 1993 [50, 51] y según el protocolo N° 108 de las técnicas *in vitro* en Toxicología (INVITTOX, *The In vitro Techniques in Toxicology*, por sus siglas en inglés) desarrollado por Itagaki en 1995 [41].

El método CAM-TBS proporciona una evaluación cuantitativa del grado de daño ocasionados en la membrana corioalantoidea del huevo. El uso del colorante de azul de tripán, y determinación espectrofotométrica para evaluar la proporción del daño en el tejido proporciona una medida más objetiva y cuantitativa de irritación que la obtenida con el método HET-CAM, que se basa en una estimación subjetiva de la lisis, hemorragia y coagulación. Al observar los investigadores los cambios vasculares inducidos por sustancias irritantes en la CAM como lisis, hemorragia o coagulación, que representan los efectos que se pueden producir en la conjuntiva o a nivel *in vivo* [50] sugirieron una modificación del método de HET-CAM en el que el daño de la membrana se cuantificaría como la cantidad de tinción de azul de tripán adsorbido sobre ella. Las células muertas (con paredes celulares dañadas) se tiñen por el colorante azul de tripán, debido a la unión con las proteínas citosólicas dentro de estas células. La cantidad del colorante adsorbido se correlaciona con la cantidad de células muertas en la CAM [41].

Este método fue diseñado para examinar el efecto perjudicial de sustancias por medición de la cantidad adsorbida de azul de tripán sobre la CAM, dañada como el punto final del ensayo. La tinción con azul de tripán, ha sido ampliamente utilizada para la medición de la viabilidad celular, la cual detecta la destrucción y desnaturalización de la membrana [52].

2.1.2.5 Ventajas y desventajas de los ensayos CAM

El método HET-CAM ya se utiliza en la industria genética para identificar el potencial irritante o sustancias ligeramente irritantes como los surfactantes durante las evaluaciones de seguridad de las formulaciones y/o materias primas. No se utiliza comúnmente para las evaluaciones de riesgo en el sentido de etiquetado y clasificación, ya que aún no ha sido reconocida como una alternativa aceptada para el ensayo *in vivo* de Draize [44].

La mayoría de los estudios de validación realizados, mostraron una correlación útil entre el método HET-CAM y el Test de Draize para la evaluación de las materias primas, sustancias y productos cosméticos. Esta correlación *in vivo* frente a *in vitro* reveló resultados similares en el área de las sustancias de ensayo, así como para tensoactivos y formulaciones a base de tensoactivos [53, 54, 55].

Aunque el método HET-CAM, en principio, es aplicable a todos los tipos de productos químicos, independientemente de sus propiedades físico-químicas, mediciones en sustancias sólidas insolubles o consistentes pueden ocasionar inconvenientes en la reproducibilidad de los resultados, mientras que los pigmentos y colorantes pueden causar interferencias mediante la tinción de la CAM [52, 54].

Estudios demuestran que la comparación del método HET-CAM y el método NRU en alcoholes/ésteres y surfactantes, observan buena correlación para los surfactantes pero no para alcoholes y ésteres [56]. En cuanto a los puntos finales medidos en el ensayo de irritación ocular *in vivo*, el método HET-CAM debe imitar la respuesta de la conjuntiva del animal en el Test de Draize.

Aunque el HET-CAM se considera que es un método establecido y fiable para propósitos de tamizaje, una limitación potencial se puede ver en la ausencia de la posibilidad de evaluar la reversibilidad y/o irreversibilidad de los efectos. La gravedad de los efectos será evaluado por el método HET-CAM, mientras que por razones metodológicas de la recuperación o la persistencia de los efectos está fuera del alcance de los diversos protocolos del método HET-CAM utilizados en la actualidad. Por esa razón, el futuro papel del método HET-CAM puede limitarse a ser sólo un elemento de una batería de las pruebas de irritación ocular.

Este ensayo presenta varias ventajas, incluyendo su sencillez, rapidez, sensibilidad, facilidad de funcionamiento y su bajo costo relativo. La principal desventaja del procedimiento es la naturaleza subjetiva de la evaluación de los resultados. Esto se supera en cierta medida por la inclusión de estándares positivos y mediante el uso de un esquema integral para eliminar los efectos irritantes de los productos químicos [39].

El método CAMVA se utiliza en la industria cosmética – principalmente en los EE.UU para la detección y evaluación de la seguridad de los cosméticos. Los diseños de los tejidos humanos han suplantado a los ensayos basados en la CAM para las empresas. El CAMVA se ha utilizado para determinar la dosis requerida para alcanzar una respuesta positiva del 50% en los 10 huevos de prueba. Ambas sustancias solubles acuosas y oleosas han sido probadas; generalmente éstos han sido en una región leve a moderada de toxicidad [44].

El estudio realizado por la Asociación Europea de Cosméticos (COLIPA, *European Cosmetics Association* por sus siglas en inglés) [57, 58] llegó a la conclusión de que el método CAMVA era más adecuado para evaluar sustancias hidroalcohólicas o comparación de sustancias no hidroalcohólicas. El método CAMVA se evalúa mejor con formulaciones a base de surfactantes en la Evaluación de Programas Alternativos (fase III) llevada a cabo por la Asociación de Cosméticos, Artículos de Tocador y Fragancias (CTFA, *The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association*, por sus siglas en inglés) de

Estados Unidos [59], en comparación con otros protocolos utilizados basados en la CAM. Una observación similar fue hecha por el Grupo de Trabajo del Grupo alternativo regulatorio inter-agencias de EE.UU. (IRAG, *U.S. Interagency Regulatory Alternatives Group*, por sus siglas en inglés) en su valoración crítica de ensayos basados en la CAM; el método CAMVA proporciona el mejor rendimiento con alcoholes [54]. Además este método, se considera adecuado como un tamizaje para el potencial de irritación de formulaciones cosméticas y de formulaciones para el cuidado personal, como sustancias elaboradas a base de alcohol. En su mayoría se ha aplicado para evaluar las sustancias en el rango de irritación leve a moderada [60], pero no para clasificar sustancias severamente irritantes de los ojos. Con el fin de facilitar la evaluación de este último, el informe final del estudio de validación COLIPA sugirió extender el tiempo de exposición CAMVA más allá de 30 minutos, así como mejorar el modelo de predicción matemática actualmente en uso [58].

El método CAM-TBS puede ser utilizado para evaluar polvos, cremas, líquidos no diluidos, o soluciones acuosas. También puede ser utilizado tanto para muestras solubles en agua y muestras poco solubles o insolubles. Una de sus principales ventajas es el hecho de que los productos químicos se pueden utilizar en las mismas concentraciones que se utilizan en ensayos *in vivo*, y por lo tanto una comparación directa se pueden hacer entre los datos *in vivo* y los datos del ensayo CAM [41].

Sin embargo, Hagino [51] obtuvo una puntuación relativamente baja con p-fenetidina. Advierten que este resultado plantea la posibilidad de que el método CAM-TBS puede dar de baja las predicciones de las puntuaciones de Draize para algunos productos químicos insolubles en agua. Un problema adicional puede surgir cuando el análisis de muestras que no puede ser totalmente lavado de la superficie de la CAM, ya que el tinte pueden unirse al material residual en lugar de la CAM, lo que resulta en predicciones sobrestimadas. En general, sin embargo, el método CAM-TBS proporciona un medio sencillo, barato, facilidad de funcionamiento y fiable para predecir irritación ocular. Se conserva las ventajas del HET-CAM; pero el método es más simple,

cuantitativo y objetivo para determinar los resultados. Las sustancias coloreadas pueden interferir con la medición del punto final [61].

2.1.2.6 Regulaciones normativas relacionadas con los ensayos alternativos.

Para que los datos toxicológicos suministrados por un método experimental puedan ser utilizados para la evaluación del riesgo/peligro y el registro de un nuevo compuesto químico, medicamento, fitosanitario, etc., se requiere que su protocolo haya sido previamente validado científicamente y aprobado por las autoridades reguladoras [62]. La aceptación por las autoridades reguladoras, de un nuevo procedimiento consiste en su aprobación e inclusión en las recomendaciones y normativas, tanto nacionales, como multinacionales (OCDE y la Unión Europea (EU, *European Unión* por sus siglas en inglés), lo que le confiere validez para su aplicación en estudios de valoración del riesgo. En la progresión de nuevos ensayos desde su concepción hasta su aceptación reguladora pueden considerarse actualmente cinco fases: desarrollo del ensayo, pre-validación, validación, evaluación y progreso hacia su aceptación reguladora [63, 64].

La gestión de los riesgos asociados al uso de las sustancias químicas industriales en la Unión Europea se basa en la Directiva 67/548 de la Comisión sobre clasificación embalaje y etiquetado de sustancias peligrosas, trata sobre los peligros potenciales intrínsecos que la sustancia puede producir [62].

Para impulsar el proceso de validación de nuevos procedimientos, la UE creó en 1991 el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos (ECVAM, *The European Centre for the Validation of Alternative Methods* por sus siglas en inglés). El centro norteamericano de validación, denominado Comité Coordinador de Inter-agencias para la Validación de Métodos Alternativos (ICCVAM, *The Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods* por siglas en inglés) ha centrado su actividad en revisar los resultados de estudios de validación patrocinados por otras instituciones [62].

También la EU y la OECD (en la actualización de la Directriz 404) establecieron un protocolo jerarquizado para detectar corrosivos o irritantes severos sobre ojos y piel. Tras considerar las propiedades fisicoquímicas, pH y el resultado de ensayos *in vitro* validados, los compuestos pueden ser clasificados directamente como irritantes severos sin experimentar en animales.

Sólo cuando no han resultado irritantes a nivel *in vitro* puede pasarse a su ensayo *in vivo*. En las directivas de la OECD no se definen cuáles son los métodos validados, aunque la legislación en Gran Bretaña acepta el método de la medición de la TER. Algunos países aceptaron ensayos para la evaluación de la irritación ocular producida por cosméticos mediante el método HET-CAM [62].

Los procedimientos oculares *in vitro* tienen una larga historia controversial en cuanto la validación de métodos de ensayo [42, 65].

En el año 2003, cuatro métodos de ensayo alternativos fueron nominados por el ICCVAM y el Centro Inter-agencia para la Evaluación de Métodos Toxicológicos Alternativos (NICEATM, *The NTP Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods* por sus siglas en inglés) para su revisión como métodos de tamizaje para irritación/corrosión severa de los ojos: ICE, IRE, HET-CAM y BCOP. Varias autoridades de la EU ya habían aceptado estos métodos para la clasificación de sustancias irritantes/corrosivos graves.

La revisión de estos métodos ICCVAM celebrados con un informe del grupo especial de expertos en marzo del año 2005 y con el aval de ICCVAM de los métodos BCOP e ICE son como tamizajes válidos para los irritantes/corrosivos oculares severos. Sin embargo, ICCVAM ha determinado que los resultados negativos aún requieren pruebas *in vivo* antes de emitir la conclusión como no es grave/corrosivo. ICCVAM declaró lo siguiente: *"En 2007, se recomiendan BCOP e ICE como pruebas de detección para la identificación de sustancias corrosivas e irritantes graves, con ciertas limitaciones; HET-CAM e IRE no se recomiendan para fines de clasificación reglamentaria de peligro, hasta*

desarrollarse y evaluarse más”. La Agencia de Drogas y Alimentos (FDA, *Food and Drug Administration* por sus siglas en inglés) y la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, *Environmental Protection Agency* por sus siglas en inglés) informó de la aceptación previa de los datos de BCOP en circunstancias específicas y se espera que continúen haciéndolo teniendo en cuenta las recomendaciones del ICCVAM. El Comité Científico Asesor del ECVAM (ESAC) indicó que es necesario seguir trabajando para el IRE y en los métodos HET-CAM [66].

A continuación se enumeran los métodos actuales alternativos de uso sin animales que sirven para propósitos de prueba de acuerdo a la regulación (aplicaciones limitadas), mostrado en la tabla 01.

Tabla 1. Métodos de la prueba de irritabilidad ocular *in vitro*

MÉTODOS	PROPÓSITOS DEL TEST	AUTORIDAD DE VALIDACIÓN	OECD TG (DIRECTRIZ DEL TEST)
ENSAYO DE OPACIDAD Y PERMEABILIDAD BOVINA (BCOP)	CORROSIÓN OCULAR/ IRRITACIÓN SEVERA	ICCVAM; ECVAM	PENDIENTE
ENSAYO EN EL OJO DE POLLO AISLADO (ICE)	CORROSIÓN OCULAR/ IRRITACIÓN SEVERA	ICCVAM; ECVAM	PENDIENTE
ENSAYO EN EL OJO DE CONEJO AISLADO (IRE)	CORROSIÓN OCULAR	(A)	---
ENSAYO EN LA MEMBRANA CORIOALANTOIDEA DEL HUEVO DE GALLINA (HET-CAM)	CORROSIÓN OCULAR	(A)	----

- (a) Aunque no avalados formalmente como resultados válidos y positivos, pueden ser utilizados para la clasificación y etiquetado de sustancias irritantes/graves en los ojos (R41), en la UE.

Fuente: Eye Irritation/ Corrosion. Non-animal Methods for Toxicity Testing. Web: <http://alttox.org/mapp/toxicity-endpoints-tests/eye-irritationcorrosion/> [66]

Sin embargo, el método HET-CAM ha sido aceptado por las autoridades británicas, francesas, holandesas y alemanas (en conjunto con el ensayo de citotoxicidad NRU); al menos para la clasificación de los irritantes graves [67, 68, 69].

2.2 Caracteres y uso cosmético de los frutos nativos del Perú

2.2.1 *Mauritia flexuosa* L. (aguaje)

***Mauritia flexuosa* L. (aguaje)** es una palmera nativa de la Amazonía y desempeña un papel importante en la compleja cadena alimentaria del bosque tropical, debido a que su fruto es un alimento promisorio de la biodiversidad amazónica [70].

El aceite del aguaje es rico en carotenoides principalmente β -carotenos y debido a ellos se ha utilizado en la producción de cosméticos, además contiene aproximadamente $1706 \pm 54 \mu\text{g}$ de carotenoides totales/g [72].

Según investigaciones realizadas con el aceite de tres morfotipos se determinó que contenían 26,4; 34,2 y 28,4 mg de β -caroteno/100g muestra; para los ecotipos amarillo, color y shambo, respectivamente [73].

El aceite también presenta altos niveles de ácido oleico (60,3%) y cantidades considerables de alfa-tocoferol (643,2 mg/g) [74].



Figura 1. Planta de *Mauritia flexuosa* L.



Figura 2. Fruto de *Mauritia flexuosa* L.

2.2.2 *Myrciaria dubia* L. (camu camu)

***Myrciaria dubia* L. (camu camu)** es una especie originaria de la región amazónica, crece naturalmente en las orillas de los ríos, pequeños charcos y cursos menores de agua en esta región. Se encuentra en estado silvestre en forma de rodales naturales en Perú, Brasil, Colombia, Venezuela y Ecuador [75]. Su mayor concentración y diversidad se encuentra en la Amazonía, siendo la región Loreto (Perú) con las condiciones medio ambientales ideales para el crecimiento y desarrollo de este frutal [71].

La composición química del fruto de camu camu en 100 g de pulpa es: agua 94,4 g, proteína 0,5 g, carbohidratos 4,7 g, grasa 0,1 g, ceniza 0,2 g, fibra 0,6 g, fósforo 17,0 mg, calcio 27,0 mg, hierro 0,5 mg, tiamina 0,001 mg, riboflavina 0,04 mg, niacina 0,062 mg, ácido ascórbico total 2.994,0 mg [76].

Su mayor importancia radica en constituir materia prima para la industria farmacéutica y cosmética, ya que sus frutos tienen alto contenido de vitamina C [75, 76].

Por su alto contenido en ácido ascórbico, tiene múltiples aplicaciones en medicina; indispensable para la elaboración y mantenimiento del colágeno, ayuda en la cicatrización de heridas, quemaduras y encías sangrantes; favorece la absorción y almacenamiento de hierro; es antioxidante; disminuye la posibilidad de formación de trombos en los vasos sanguíneos; ayuda a combatir las enfermedades virales y bacterianas; tiene un papel relevante en el metabolismo del calcio; evita la formación de agentes cancerígenos y favorece la disminución de colesterol en la sangre, entre otros [77].

Se evaluó la irritabilidad de las formulaciones cosméticas con extractos de camu camu mediante el método HET-CAM cualitativo y HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS), obteniéndose como resultado que ninguno de los productos cosméticos con extracto de camu camu, produjo ruptura de la membrana corioalantoidea [1].



Figura 3. Planta de *Myrciaria dubia* L.



Figura 4. Fruto de *Myrciaria dubia* L.

2.2.3 *Solanum sessiliflorum* D. (cocona)

***Solanum sessiliflorum* D. (cocona)** tiene como origen el Amazonas Occidental, en el alto río Orinoco donde fue primitivamente cultivada por los amerindios precolombinos. Se encuentra distribuida en la región amazónica de Brasil, Perú, Ecuador, Colombia y Venezuela [78].

El contenido nutricional de la cocona en 100 gramos de pulpa es: humedad 88,52 g, extracto etéreo 1,21 g, proteína 0,78 g, fibra dietética (fracción soluble) 1,22 g, fibra dietética (fracción insoluble) 2,59 g, ceniza 0,61g, carbohidratos totales 8,88g, calcio 0,0124 mg, fósforo 0,26 mg, hierro 0,1293 mg, pro-vitamina A (Beta carotenos) 0,06 mg, vitamina B1 0,03 mg, vitamina C 58,7 mg, azúcares totales 2.087 mg, glucosa 1.273 mg, fructosa 578 mg, sacarosa 236 mg [79]. Debido a la baja relación de los sólidos solubles y la acidez, que relaciona el sabor de la fruta, la cocona presenta poco grado de dulzor. Por esto, el fruto es raramente consumido al natural, excepto como complemento de bebidas alcohólicas. Los frutos se usan en jugos, néctar, dulces, mermeladas y compotas [80, 81].



Figura 5. Planta de *Solanum sessiliflorum* D.



Figura 6. Fruto de *Solanum sessiliflorum* D.

2.2.4 *Physalis peruviana* L. (aguaymanto)

***Physalis peruviana* L. (aguaymanto)** conocida comúnmente como aguaymanto, uchuva, tomate silvestre, etc.; es una planta originaria de los Andes Peruanos perteneciente a la familia de las Solanáceas, y con alto potencial de multiplicación ya que crece en suelos pobres. Una planta puede producir cerca de 300 frutos, que son bayas de color naranja-amarillo, de forma globosa, con un peso entre 4-5 g y sabor agridulce. El fruto fresco es rico en Vitamina A (648 UI/100g) y contiene Vitamina C (26mg), fibra (4.8g), proteínas (1.9g), fósforo, hierro, potasio y zinc [84, 85]. Se le han atribuido muchas propiedades medicinales tales como antiasmático, diurético, antiséptico, sedante, analgésico, fortifica el nervio óptico, alivia problemas de garganta, elimina parásitos intestinales y amebas; además se reportan sus propiedades hipoglucemiantes [84, 85]. El aguaymanto contiene compuestos fenólicos, posee capacidad antioxidante y es fuente de vitamina C [86]. Asimismo, contiene importantes cantidades de carotenoides [87]. El aguaymanto está considerado dentro del grupo con moderada actividad antioxidante [88, 89]. Un estudio previo mostró que el extracto etanólico de tallos de aguaymanto posee actividad citotóxica frente a las células Hep G2 (hepatoma humano) [90]. Otro

estudio tuvo como resultado que el aguaymanto induce apoptosis en la línea celular Hep G2 [91].

En otro estudio se determinó la actividad citotóxica del extracto etanólico de las hojas y tallos de aguaymanto en cultivos de las líneas celulares colo-205 (adenocarcinoma de colon humano) y K562 (leucemia mieloide crónica) [92].



Figura 7. Planta de *Physalis peruviana* L.



Figura 8. Fruto de *Physalis peruviana* L.

2.2.5 *Passiflora mollissima* HBK (tumbo serrano)

***Passiflora mollissima* HBK (tumbo serrano)** es una baya de forma elipsoidal de 7 a 10 cm de largo, de color verde claro cuando se está desarrollando y completamente amarillo al madurar. La pulpa es firme, carnosa, jugosa y con pequeñas semillas de color negro. Su sabor es exótico, suave, agradable, perfumado, algo ácido y astringente [93]. El tumbo serrano contiene un elevado porcentaje de vitamina C y carotenos con relación a los demás pasifloráceas alcanzando a 78 mg %. El estudio refiere un porcentaje de oligoelementos de 536,03 mg%. En relación al contenido de aceite presenta un 11,16%, siendo su mayor constituyente el ácido linoleico que alcanza un 71,45%, ácido graso esencial enriquecido con la presencia de carotenos con mayor proporción [94]. En otro estudio, se determinó que posee una alta capacidad para atrapar las diversas especies reactivas de oxígeno, especialmente los radicales libres peróxilos (ROO^\bullet), pero también los radicales hidroxilos (OH^\bullet), superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) y posee un valor de la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC, *oxygen radical absorbance capacity*, por sus siglas en inglés) igual a 108.164,9 mmol de Trolox/100 g de pulpa seca, más alto que la mayoría de las frutas y verduras. [95].



Figura 9. Planta de *Passiflora mollissima* HBK



Figura 10. Fruto de *Passiflora mollissima* HBK

2.3 Conceptos teóricos sobre los excipientes en formulaciones cosméticas

2.3.1 Utilización de polietilenglicoles para formulaciones cosméticas

Los polietilenglicoles (PEG, *Polyethylene glycol* por sus siglas en inglés) y sus derivados aniónicos o no iónicos son ampliamente utilizados en cosmética como agentes tensoactivos, emulsionantes, acondicionadores de la piel, humectantes y de limpieza.

Debido a su presencia en muchos cosméticos, una evaluación de su seguridad es crítica, y más aún cuando el potencial de exposición de los consumidores puede ser crónico y extenso. Además de su uso en cosméticos, muchos de los compuestos tienen otras aplicaciones; por ejemplo, en la industria farmacéutica se utilizan como vehículos de fármacos y como bases para ungüentos, cápsulas, tabletas y píldoras, supositorios, aglutinantes recetas líquidas y en

medicamentos veterinarios, incluidos parenterales, las preparaciones tópicas, oftálmicas, orales y rectales. Otras aplicaciones incluyen su uso como ingredientes en jabones y detergentes, en la industria textil y de cuero, en plásticos y resinas, en la industria papelera, en la impresión, en la industria cerámica y vidrio, en las industrias del caucho, petróleo, minería y metales, para la conservación de la madera y productos intermedios como químicos [96].

La característica excepcional de esta clase de compuestos es su solubilidad en agua y su capacidad para solubilizar otras sustancias en los preparados. Son compuestos estables, no volátiles, que no se hidrolizan o, en ausencia de oxígeno, se deterioreen durante el almacenamiento [96].

2.3.2 Estudios de irritabilidad de los polietilenglicoles en formulaciones cosméticas

El PEG, sus éteres y sus ésteres de ácidos grasos producen poca o ninguna irritación ocular o dérmica, y tienen efectos tóxicos agudos y crónicos extremadamente bajos. Los compuestos no penetran fácilmente en la piel intacta, y en vista de la amplia utilización de preparados que contienen derivados de PEG, sólo unos pocos informes de casos sobre reacciones de sensibilización se han publicado, involucrando principalmente a pacientes con exposición a los PEG en medicamentos o después de la exposición a la piel lesionada o crónicamente inflamada. Sus éteres y ésteres de ácidos grasos son seguros para su uso en cosméticos. Teniendo en cuenta toda la información disponible en artículos científicos, para los compuestos estrechamente relacionados, se puede deducir que estos compuestos actualmente utilizados en las preparaciones cosméticas no presentan un riesgo para la salud humana [96].

Sólo los aceites de ricino PEG y aceites de ricino PEG- hidrogenados han causado reacciones anafilácticas cuando se usan en medicamentos intravenosos; su uso tópico en los cosméticos se considera seguro, ya que no se espera que estén disponibles sistémicamente [96].

2.4 Conceptos teóricos sobre estandarización y validación de una técnica analítica

2.4.1 Estandarización

Estandarizar un método analítico consiste en verificar y documentar, que este conduzca con un alto grado de seguridad a la obtención de resultados precisos y exactos dentro de las especificaciones y los atributos de calidad previamente establecidos. La estandarización de un método analítico es un proceso riguroso que dependiendo de la técnica analítica a la que pertenezca el procedimiento, la matriz de estudio, la sustancia a analizar, la cantidad de parámetros de la estandarización, y de la logística empleada para su desarrollo, puede requerir de un tiempo muy considerable [97].

2.4.2 Validación

La validación de una metodología analítica, es un proceso de seguimiento que comprende la determinación de una serie de parámetros que demuestren que los resultados del método son confiables y reproducibles. Cada uno de los parámetros a validar debe tener un diseño experimental planteado donde se define la hipótesis nula (H_0), la hipótesis alternativa (H_1), se fija la probabilidad de error (p) o confiabilidad, los grados de libertad (gl), etc. Posterior al diseño, se compara el valor experimental con el tabulado para aceptar o no la hipótesis planteada [98].

El objetivo principal de la validación analítica es asegurar que un procedimiento analítico seleccionado dará resultados reproducibles y confiables que sean adecuados para el propósito previsto. De ahí que sea necesario definir debidamente tanto las condiciones en que el procedimiento ha de emplearse como el objetivo previsto para el mismo [99].

Estos principios son igualmente aplicables a los procedimientos microbiológicos y biológicos [100].

2.4.2.1 Linealidad y Rango

La linealidad es la capacidad del método para proporcionar resultados que son directamente o por medio de transformaciones matemáticas proporcionales a la concentración de la sustancia a analizar en la muestra dentro de un rango establecido.

Siempre que sea posible se buscará una respuesta de tipo lineal que facilitará su trazado, interpolación e interpretación [97].

a. Procedimiento de determinación de la linealidad

Para evaluar la linealidad existen unos criterios mínimos aplicables a cualquier procedimiento.

- Dentro del rango establecido se recomiendan estudiar 3-5 niveles de concentración y analizarlas por triplicado.
- Para realizar los análisis se recomienda hacer pesadas independientes, ya que así se elimina el posible error sistemático que se podría arrastrar partiendo de una sola pesada realizando diluciones.
- El número de repeticiones de cada muestra dependerá de la precisión del sistema empleado, y de lo que se decida incluir como rutina en el procedimiento de la sustancia a validar.

Con los resultados del estudio de la linealidad se prepara una tabla relacionando las cantidades o concentraciones **x** (variable independiente) y la respuestas **y** (variable dependiente).

La relación entre ambas variables se expresa matemáticamente como una recta de regresión del tipo **$y = b \cdot x + a$** , obtenida por un método de ajuste, si la recta no pasa cerca al origen significa que el método a evaluar está afectado por un error sistemático por defecto o por exceso en el intervalo estudiado [97].

b. Evaluación estadística de la linealidad

El estudio de la linealidad no sólo implica una representación gráfica sino que es necesario realizar una comprobación estadística:

- Ecuación de la recta

En la recta de regresión, la ecuación de la recta es: $y = b * x + a$; donde **x** es la concentración, **y** la respuesta, **b** el valor de la pendiente (asociada con la sensibilidad del método) y **a** el término independiente (asociado al error sistemático) [97].

- Coeficiente de correlación (r)

El coeficiente de correlación indica el grado de relación entre la variable **x** (concentración) y la variable **y** (respuesta). Su valor máximo es 1; si **r** es cercano a la unidad significa que existe correlación con una probabilidad elevada. Un valor nulo indica ausencia de relación lineal entre las variables. El valor recomendable para el coeficiente de correlación es $> 0,999$, aunque en el caso de impurezas se admite $> 0,990$. La información obtenida mediante el coeficiente de correlación es limitada y no justifica por sí sola la linealidad [97].

c. Límite de cuantificación

El límite de cuantificación es la concentración más baja de analito en la muestra, que puede ser determinada con precisión y exactitud aceptables cuando se emplea el procedimiento exigido.

Se mide mediante el análisis de muestras que contengan cantidades conocidas de la sustancia para analizar en disminución, y la determinación del nivel más bajo al cual pueden alcanzarse grados aceptables de exactitud y precisión [99].

2.4.2.2 Precisión

Es la concordancia mutua entre datos que se han obtenido de la misma forma, indica la medida del error aleatorio de un análisis. Se divide en repetibilidad y reproducibilidad [98].

a. Repetibilidad

Se refiere a la concordancia de los resultados recolectados por el mismo investigador, los mismos reactivos, laboratorio e instrumento en un corto periodo de tiempo; se evalúa determinando el coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa (RSD), mediante la siguiente ecuación [98, 101]:

$$CV \text{ o } RSD = (S/X) * 100$$

S: desviación estándar

X: media aritmética

b. Reproducibilidad

Es la precisión del procedimiento cuando se efectúa bajo condiciones diferentes, usualmente en diferentes laboratorios, con muestras supuestamente idénticas, obtenidas del mismo lote de material homogéneo. También se puede obtener información valiosa efectuando comparaciones de los resultados obtenidos por distintos analistas, mediante el uso de diferentes equipos, o llevando a cabo el análisis en diferentes momentos [100, 102].

2.4.2.3 Robustez

Se refiere a la validez de aplicación del método en las condiciones dadas, así como su reproducibilidad en dichas condiciones. Se dice que un método es robusto, cuando los datos de variabilidad están dentro de los límites establecidos por parámetros como exactitud y precisión [98].

2.4.2.4 Exactitud

La exactitud del procedimiento empleado consiste en la proximidad de los resultados obtenidos al valor real. La exactitud puede determinarse aplicando el procedimiento a las muestras del material a examinarse, cuando han sido preparadas con exactitud cuantitativa.

Siempre que sea posible, esas muestras deben contener todos los componentes del material, incluyendo la sustancia a analizar. También es posible determinar la exactitud comparando los resultados con los obtenidos empleando otro procedimiento ya comprobado [100].

a. Porcentaje de recuperación

Es la medición que se obtiene al evaluar la concentración del analito en la porción de la muestra o adicionando a ésta (+/- 10%), que es cuantificada por el método de ensayo. Una vez que se han evaluado las características iniciales de la matriz a examinar, sumada a la cantidad de la sustancia a analizar suministrada adicionalmente, se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%R = ((CF-CU)/CA) * 100$$

Dónde:

CF = Concentración de la sustancia, medida en la muestra fortificada.

CU = Concentración de la sustancia, medida en la muestra sin fortificar.

CA = Concentración de la sustancia adicionada [103].

2.4.3 Estandarización y validación del método HET-CAM

El método de HET-CAM se ha evaluado en diversos estudios de validación realizados, evaluando el potencial de alternativas *in vitro* como reemplazo para el Test de Draize. Estos incluyen los estudios de colaboración llevadas a cabo por las empresas de cosméticos [48, 53] y los que están dentro del Programa

CTFA en Estados Unidos [59, 104, 105]. Dentro de Europa, se llevaron a cabo estudios de validación independientes por COLIPA [55, 57]. El Ministerio Federal de Investigación y Tecnología Alemán (BMFT, *Bundesministerium fuer Forschung und Technik* por sus siglas en alemán) junto con la Agencia Federal de Salud Alemana BGA (*Bundes Gesundheitsant-Alemania* por sus siglas en alemán) [54, 106, 107, 108] la Asociación Francesa para el bienestar de los animales de laboratorio (OPAL, *Oeuvre Pour l'assistance aux Animaux de Laboratoire* por sus siglas en francés) [109] y el estudio entre laboratorios llevan a cabo bajo los auspicios del Ministerio de Salud y Bienestar de Japón junto con la Asociación de la Industria Cosmética de Japón [52].

Además, el método HET-CAM se incluyó en el estudio de validación CE/HO en todo el mundo [110]. El CAMVA se ha incluido en varios estudios de validación entre los cuales son ensayo Fase III de la Asociación de Fabricantes de Jabones y Detergentes (SDA, *Soap and Detergent Association* por sus siglas en inglés) [49], la validación COLIPA [58], el estudio CTFA de los Estados Unidos [111] y el Grupo IRAG trabajando en ensayos basados en CAM [54]. El estudio llevado a cabo bajo los auspicios del SDA [49] y la evaluación colectiva de siete alternativas de prueba de Draize realizadas por Sina [112] encontraron una buena correlación con los valores del MAS en el ensayo de Draize.

El método CAM-TBS fue parte del proyecto titulado "Estudios sobre los métodos de ensayo para evaluar la seguridad de nuevos ingredientes de los cosméticos " [61] del Ministerio de Salud y Bienestar japonés. Se encontró que tenía una variabilidad menor que el método HET-CAM, y mostró una buena correlación con la puntuación del promedio máximo de Draize (MAS, *maximum average score* por sus siglas en inglés) cuando se clasificaron los productos químicos de ensayo de acuerdo con su estado líquido y sólido [52].

2.4.4 Método HET-CAM como parámetro de inocuidad en la industria cosmética.

Las regulaciones internacionales oficiales solicitan la evaluación de seguridad toxicológica de las materias primas existentes, así como de los productos internos en los productos cosméticos [55].

La prueba Draize en el ojo del conejo [113], es actualmente el único método aceptado a nivel mundial para fines de regulación (Directrices de la OCDE); sin embargo, la necesidad y validez de dichos ensayos en animales son polémicamente discutidas por un creciente número de personas y científicos. La necesidad de establecer y aceptar métodos *in vitro* apropiados se ve desafiada por la industria cosmética y química, y por las nuevas limitaciones previstas en la realización de ensayos con animales, en el futuro. Uno de los ejemplos más impresionantes de las limitaciones esperadas es la Sexta Enmienda de los Cosméticos Directivas de la UE, en el que se preveía la prohibición de productos cosméticos que contengan ingredientes experimentados en animales a partir de principios de julio de 2000 [55].

Durante los últimos años una variedad de métodos *in vitro* se han publicado, especialmente para predecir el potencial de irritación de los ojos [114]. El interés para aumentar la fiabilidad de los ensayos de irritación *in vitro*, y para discriminar entre los irritantes débiles y fuertes, ha conllevado a establecer ensayos toxicológicos que han incluido métodos *in vitro* durante más de una década [115], para analizar los mecanismos de los diferentes efectos de irritación, así como para propósitos de tamizaje.

Esta estrategia prospectiva en el uso de ensayos apropiados *in vitro* para la evaluación de riesgos de los nuevos productos químicos es generalmente aceptada y exigida por los reguladores de la UE. Se menciona en la actual adaptación 18a de la Directiva de la UE 67/548/CEE que válida los resultados de ensayos *in vitro* son adecuados para la clasificación de las propiedades irritantes para el ojo [55].

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiales y métodos

3.1.1 Tipo de estudio

- Estudio experimental, *in vitro*, cualitativo y cuantitativo

3.1.2 Equipos

- Licuadora semi-industrial OSTER modelo BLSTMG-RDO
- Cocinilla eléctrica SELECTA modelo 0370456
- Balanza digital ACCULAB modelo 21450967
- Balanza SARTORIUS BL 50
- Espectrofotómetro PERKIN ELMER modelo LAMBDA 35
- Microscopio óptico CARL ZEISS modelo AXIOSTAR PLUS
- Incubadoras artesanales

3.1.3 Materiales

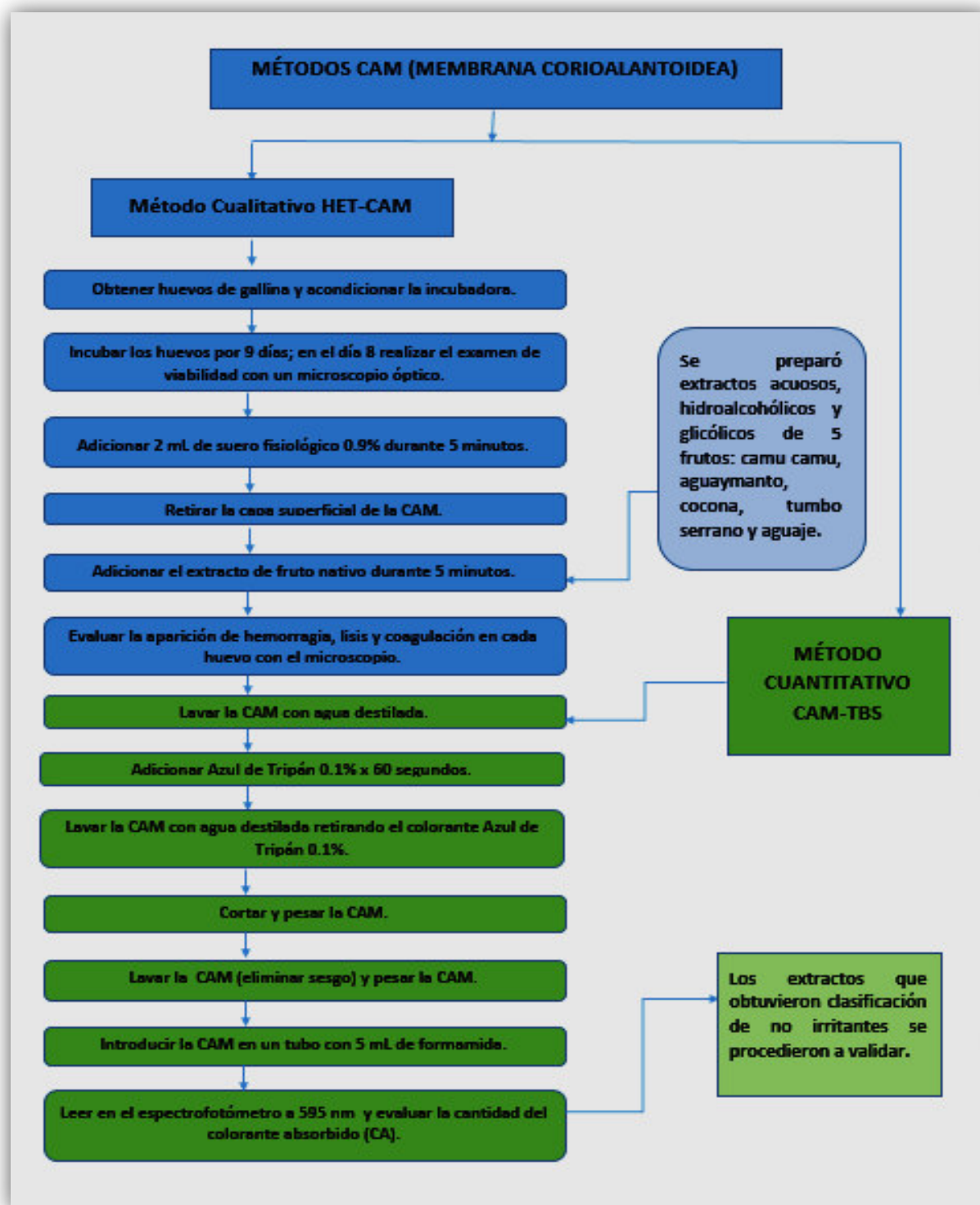
- Probetas de 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL (Pírex)
- Beaker de 25 mL, 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL (Pirex)
- Baguetas de vidrio
- Malla organdí
- Embudos de vidrio
- Termómetro digital SENSOTERM 100°C

3.1.4 Reactivos y solventes

- Agua desionizada comercial
- Agua destilada
- Etanol 70%
- Propilenglicol (se realizó una dilución al 50%)

3.1.5 Representación gráfica del estudio

Gráfico N°1. Esquema del estudio con los métodos *in vitro* basado en la CAM



3.1.6 Obtención de muestras

Las muestras para análisis fueron los frutos de las siguientes especies:

- *Physalis peruviana* L. (aguaymanto)
- *Myrciaria dubia* L. (camu camu)
- *Mauritia flexuosa* L. (aguaje)
- *Solanum sessiliflorum* D. (cocona)
- *Passiflora mollissima* HBK (tumbo serrano)

Los frutos de camu camu, aguaje y cocona fueron proveídas de los cultivos de la empresa AGROSELVA S.A.C. Se visitó las zonas de cultivo en el distrito de Pichanaqui, Chanchamayo, Junín para la evaluación de la cosecha de las frutas. El aguaymanto y el tumbo serrano fueron proveídos de los cultivos por la empresa Agroindustria Peruana de Alimentos AYRU S.A.C. Se visitó las zonas de cultivo en Carhuaz, Huaraz, Ancash para la evaluación de la cosecha de las frutas. Las frutas obtenidas se mantuvieron en condiciones ambientales adecuadas (temperatura 8 – 10°C).

3.1.7 Elaboración de extractos

Los extractos acuosos, hidroalcohólicos y glicólicos de las frutas se elaboraron en el Área de Investigación y Desarrollo de la empresa AYRU COSMETIC SAC.

3.1.8 Tratamientos previos a la obtención de los extractos

3.1.8.1 Selección

Se realizó una selección de la fruta de acuerdo a su estado de madurez, separando las partes blandas; así como hongos y materia extraña.

3.1.8.2 Lavado

Luego de seleccionar la fruta, se realizó el lavado de la fruta con agua potable y con agua destilada, en 3 repeticiones cada una.

3.1.8.3 Pesado

Se realizó el pesaje de la fruta, antes y después de realizar el proceso de pelado, con la finalidad de obtener el rendimiento de fruta en estado óptimo y residuos.

3.1.8.4 Pelado

Luego del pesado de la fruta, se realizó el pelado de las frutas, en las siguientes condiciones:

- **Fruto de aguaje.** Se colocó el fruto en agua caliente durante 60 segundos con la finalidad de eliminar la cáscara con facilidad y de forma manual.
- **Fruto de tumbo serrano.** Se corta la cáscara por la mitad y se separa la pulpa en recipientes.

No se realizó el proceso de pelado para los frutos de camu camu, cocona y aguaymanto.

3.1.8.5 Tratamiento adicional para la fruta

Luego del pelado de la fruta, se realizaron tratamientos adicionales a las frutas, según cada condición en particular:

- **Fruto de aguaje.** Se realizó el deshuesado, eliminando la semilla y obteniendo la pulpa de aguaje.
- **Fruto de cocona.** Se realizó el picado en trozos pequeños para una mejor extracción de componentes.
- **Fruto de camu camu.** Cada fruto se dividió en dos partes y se eliminó las semillas.

No se realizó algún tratamiento adicional para los frutos de aguaymanto y tumbo serrano.

3.1.9 Elaboración de los extractos acuosos

Para obtener los extractos acuosos, se realizó mediante la extracción con agua desionizada mediante las siguientes condiciones:

- **Extracto de fruto de aguaje.** Se colocaron 50 gramos de fruto de aguaje pelado y deshuesado con 100 mL de agua destilada en un beaker y se sometió a calentamiento durante 30 minutos a 90°C. Luego se dejó enfriar y se filtró en una malla organdí para obtener el extracto acuoso de aguaje.
- **Extracto de fruto de cocona.** Se colocaron 50 gramos de fruto de cocona pelada y picada con 100 mL de agua destilada en un beaker y se sometió a calentamiento durante 30 minutos a 90°C. Luego se dejó enfriar y se filtró en una malla organdí para obtener el extracto acuoso de cocona.
- **Extracto de fruto de camu camu.** Se colocaron 100 gramos de fruto de camu camu con 20 mL de agua destilada en una licuadora semi-industrial. Luego se procedió a licuar y se filtró en una malla organdí para obtener el extracto acuoso de camu camu.
- **Extracto de fruto de aguaymanto.** Se colocaron 100 gramos de fruto de aguaymanto con 20 mL de agua destilada en una licuadora semi-industrial. Luego se procedió a licuar y se filtró en una malla organdí para obtener el extracto acuoso de aguaymanto.
- **Extracto de fruto de tumbo serrano.** Se colocaron 100 gramos de pulpa sin semilla de tumbo serrano con 20 mL de agua destilada en una licuadora semi-industrial. Luego se procedió a licuar y se filtró en una malla organdí para obtener el extracto acuoso de tumbo serrano.

3.1.10 Elaboración de los extractos hidroalcohólicos

Para obtener los extractos hidroalcohólicos, se realizó mediante el método de extracción con etanol 70% a temperatura ambiente (25°C). Se colocaron 50 gramos de fruto con 50 mL de etanol al 70% en una licuadora semi-industrial. Luego se procedió a licuar y se filtró en una malla organdí hasta obtener el extracto hidroalcohólico.

3.1.11 Elaboración de los extractos glicólicos

Para obtener los extractos glicólicos, se realizó mediante el método de extracción con propilenglicol al 50% a temperatura ambiente (25°C). Se colocaron 50 gramos de fruto con 50 mL de propilenglicol al 50%, en una licuadora semi-industrial. Luego se procedió a licuar y se filtró en una malla organdí hasta obtener el extracto glicólico.

3.2 Evaluación de la irritabilidad ocular de los extractos

3.2.1 Estandarización del método HET-CAM

Para estandarizar el método HET-CAM, se utilizaron huevos fértiles de *Gallus gallus domesticus* (especie resistente a enfermedades) suministrados por la criandera Orfelinda, en el distrito de Chorrillos, departamento de Lima, mediante negociación exclusiva con la empresa AYRU COSMETIC SAC y la tesisista. Se vigilaron los días de incubación de los huevos, así como la colecta de los huevos fértiles.

3.2.2 Método HET-CAM

El proceso de incubación de los huevos comenzó entre 1 y 2 días después de ovado, los cuales se mantuvieron bajo condiciones normales de incubación artificial hasta el noveno día en que se determinó el potencial irritante [116] (figura 11, 12 y 13). El octavo día se evaluó la viabilidad de los huevos fértiles, con observación en un microscopio óptico y luz artificial, escogiendo los huevos en los que se distingue la disposición de venas de tamaño regular (figura 14).

Con ayuda de una tijera y pinza, se realizó un orificio en la zona de la cámara de aire, dejando expuesta la CAM, los huevos con la membrana corioalantoidea lesionada no son aceptados, ni aquellos que presentan un desarrollo embrionario anormal. Se adicionó 2 mL de suero fisiológico para humedecer la capa que cubre la CAM, durante 5 minutos. Luego se procede a retirar la capa con una pinza metálica (figura 15). Después se aplicó 0,3 mL del extracto a evaluar, sobre la CAM expuesta, la evaluación se realizó por triplicado. Como controles positivos se utilizaron soluciones de NaOH 0,1N y lauril sulfato de sodio (LSS) 0,05 N; en estos casos sólo son necesarios 2 huevos por patrón. El tiempo (segundos) de la aparición de hemorragia, lisis y coagulación se anotó dentro de los 5 minutos y se ingresó los datos a la siguiente ecuación:

$$I.I. = ((301-TH)/300) \times 5 + ((301-TL)/300) \times 7 + ((301-TC)/300)$$

Dónde:

- **I.I.** = Índice de irritación
- **TH** = Tiempo de aparición de hemorragia
- **TL** = Tiempo de aparición de lisis
- **TC** = Tiempo de aparición de coagulación

Una vez obtenido los índices de irritación de los extractos y controles, se compara con la tabla 2 para determinar si el extracto es irritante.

Tabla 2. Clasificación para determinar la irritabilidad del producto, mediante método HET-CAM

RANGO HET-CAM	CATEGORÍAS DE IRRITACIÓN
0 – 0,9	NO IRRITANTE
1,0 – 4,9	IRRITANTE LEVE
5,0 – 8,9	IRRITANTE MODERADO
9,0 – 21,0	IRRITANTE SEVERO

Fuente: Lüpke N. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food and Chemical Toxicology*. 1985 [38]

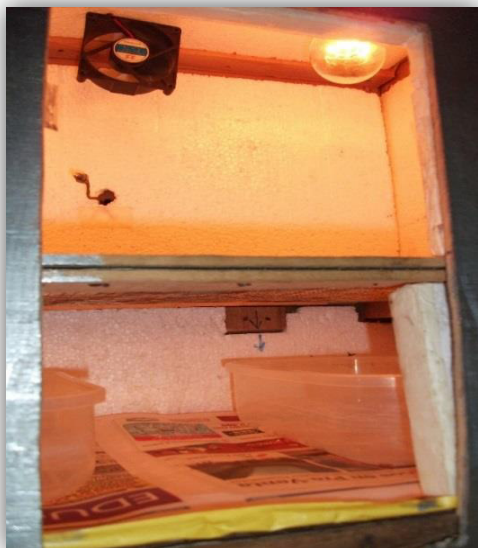


Figura 11. Incubadora artesanal (interior)



Figura 12. Incubadora artesanal (lateral)



Figura 13. Incubadora artesanal (frontal)



Figura 14. Limpieza y enumeración de los huevos a analizar. Izquierda. Se marca el área del huevo que será cortado. Derecha. Se enumera cada huevo

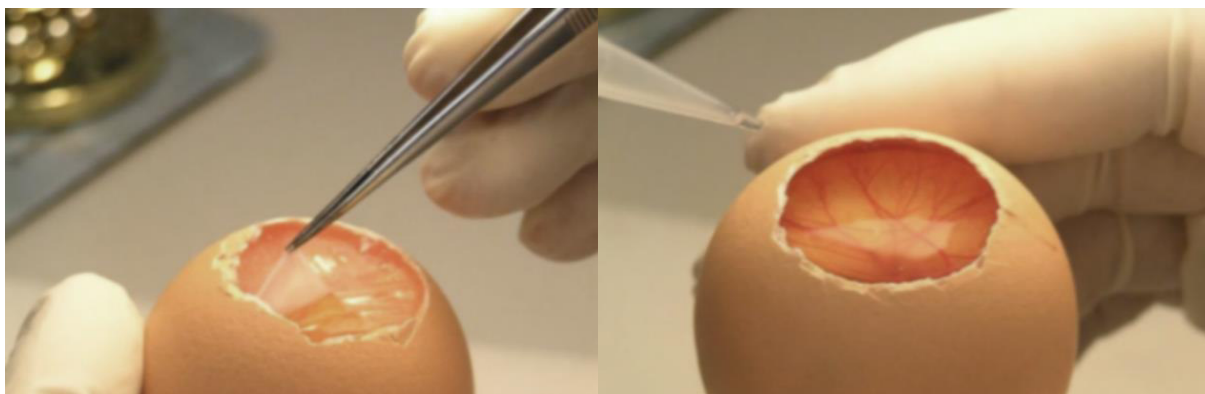


Figura 15. Preparación de la CAM de los huevos a analizar. Izquierda. Retiro de membrana superficial de la CAM. Derecha. Contacto de los extractos con la CAM

3.2.3 Método de la membrana corioalantoidea mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS)

Para el método CAM-TBS se efectuó, previamente, un escaneado (500-700 nm) para conocer el punto de máxima absorbancia del colorante (INVITTOX, protocolo N° 108) [41].

Una vez concluida la observación de la membrana corioalantoidea y registrado los signos descritos anteriormente, se procede de la siguiente manera:

- La membrana se lava con agua destilada y se depositan 0,5 mL de la solución de azul de tripán al 0,1% en buffer fosfato, dejándola actuar durante 60 segundos. Luego, se retira el colorante con agua destilada y la membrana se corta y pesa en una balanza analítica. La membrana lavada, se pesa para eliminar el sesgo de la diferencia en el tamaño de cada muestra. Posteriormente se introduce en un tubo con 5 mL de formamida para arrastrar el colorante fijado y luego se retira la membrana.
- Se mide la absorbancia de la formamida con el colorante y se compara frente a una recta patrón con concentraciones conocidas del colorante (5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M), a una longitud de onda de 595 nm. La detección de colorante absorbido indica pérdida de la integridad de la membrana corioalantoidea.

La determinación del potencial irritante de la sustancia de ensayo se realiza según la ecuación:

$$CA = b \times 5/1000 \times 10^9 \text{ nmoles}$$

Dónde:

- **CA**= Cantidad de colorante absorbido
- **b** = Concentración de colorante (obtenido por ploteo de la curva patrón) /mg de membrana.

La comparación se realiza entre los embriones tratados con las sustancias de ensayo y los controles positivo y negativo.

Con el dato obtenido se determina la clasificación de irritación, según la tabla 3.

Tabla 3. Clasificación para determinar la irritabilidad del producto, mediante método CAM-TBS

CANTIDAD DE COLORANTE ABSORBIDO	CATEGORÍA
$\leq 0,100$ nmoles/mg	NO IRRITANTE
0,100 – 0,150 nmoles/mg	IRRITANTE MODERADO
$\geq 0,150$ nmoles/mg	IRRITANTE SEVERO

Fuente: García L.; Gleiby M.; Montes de Oca N.; Hidalgo L. Estudio de irritación ocular y dérmica de *Pochonia chlamydosporia* var. *Catenulata*. *Rev. Toxicol.* 2004. [117]

3.2.4 Validación del método de la membrana corioalantoidea mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS)

3.2.4.1 Linealidad

Para comprobar la linealidad del método CAM-TBS se probó la linealidad de las sustancias de referencia (NaOH y lauril sulfato de sodio (LSS)) a concentraciones de 0,01 N a 0,1 N, calculándose la recta de regresión, el coeficiente de variación y el coeficiente de correlación.

Los resultados fueron procesados en el programa estadístico SPSS 15.

3.2.4.2 Precisión

Este parámetro incluye la repetibilidad y reproducibilidad.

a. Repetibilidad

Para el análisis de la repetibilidad se realizaron 15 repeticiones de la evaluación del método CAM-TBS de cada extracto. Se determinó la desviación estándar, el coeficiente de variación y la homogeneidad de las varianzas entre los resultados obtenidos para cada extracto mediante la prueba de Levene.

b. Reproducibilidad

Para el análisis de la reproducibilidad, cada uno de los 2 analistas realizó 3 repeticiones de la evaluación del método CAM-TBS de cada extracto por cada día de análisis durante 2 días; realizándose 12 determinaciones en total por cada extracto evaluado. Se determinó la desviación estándar, el coeficiente de variación y la prueba *t* de Student.

3.2.4.3 Robustez

La robustez del método se evaluó considerando las condiciones entre dos laboratorios de análisis. Para el análisis de la robustez en cada laboratorio se realizó 3 repeticiones de la evaluación del método CAM-TBS de cada extracto evaluado por cada día de análisis durante 3 días; realizándose 9 determinaciones en total por cada extracto evaluado en cada institución evaluada. Se determinó la desviación estándar, el coeficiente de variación y la prueba *t* de Student. Los laboratorios de análisis fueron:

- Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres
- Empresa INGENIOIDEA SAC

3.2.4.4 Exactitud

Para el estudio de la exactitud se empleó el método de adición de patrón a diferentes niveles: 0,08 N, 0,1 N y 0,12 N (80, 100 y 120 %).

Se aplica la evaluación estadística, la prueba de Correlación de Pearson entre las concentraciones corregidas y porcentaje de recuperación (%) de cada extracto.

IV. RESULTADOS

4.1 Método HET-CAM

Se ha encontrado que el período de exposición de 5 minutos a la sustancia de ensayo es suficiente para revelar efectos tóxicos/irritantes (la exposición más amplia no parece producir cualquier información adicional) [38].

Véase la tabla 5 en comparación con los resultados obtenidos con los controles de la tabla 4.

Tabla 4. Resultados de los controles del método HET-CAM

CONTROL	TIPO DE CONTROL	TIEMPO DE REACCIÓN (SEGUNDOS)			ÍNDICE DE IRRITACIÓN	CLASIFICACIÓN
		HEMORRAGIA	LISIS	COAGULACIÓN		
SUERO FISIOLÓGICO	BLANCO	301	301	301	0,00	NO IRRITANTE
LAURIL SULFATO DE SODIO*	CONTROL POSITIVO 1	301	124	155	8,51	IRRITANTE MODERADO
HIDRÓXIDO DE SODIO**	CONTROL POSITIVO 2	181	112	155	10,79	IRRITANTE LEVE
ETANOL	SOLVENTE 1	301	287	198	3,42	IRRITANTE LEVE
PROPILENGLICOL	SOLVENTE 2	301	301	253	1,44	IRRITANTE LEVE

* Ver la figura 16

** Ver la figura 17

Tabla 5. Resultados del método HET-CAM de los extractos

EXTRACTO	TIPO DE EXTRACTO	TIEMPO DE REACCIÓN (SEGUNDOS)			ÍNDICE DE IRRITACIÓN	CLASIFICACIÓN
		HEMORRAGIA	LISIS	COAGULACIÓN		
AGUAYMANTO	ACUOSO	301	301	155	4,38	IRRITANTE LEVE
	HIDROALCOHÓLICO	301	196	122	7,82	IRRITANTE MODERADO
	GLICÓLICO*	242	188	301	3,62	IRRITANTE LEVE
CAMU CAMU	ACUOSO	301	301	155	4,38	IRRITANTE LEVE
	HIDROALCOHÓLICO	301	301	110	5,73	IRRITANTE MODERADO
	GLICÓLICO**	301	301	90	6,33	IRRITANTE MODERADO
AGUAJE	ACUOSO	301	301	159	4,26	IRRITANTE LEVE
	HIDROALCOHÓLICO	301	301	93	6,24	IRRITANTE MODERADO
	GLICÓLICO***	301	32	127	11,50	IRRITANTE SEVERO
COCONA	ACUOSO	301	301	301	0,00	NO IRRITANTE
	HIDROALCOHÓLICO ****	121	301	183	6,54	IRRITANTE MODERADO
	GLICÓLICO	301	68	62	11,50	IRRITANTE SEVERO
TUMBO SERRANO	ACUOSO	301	301	301	0,00	NO IRRITANTE
	HIDROALCOHÓLICO *****	301	301	163	4,14	IRRITANTE LEVE
	GLICÓLICO	185	301	127	7,15	IRRITANTE MODERADO

* Ver la figura 18

** Ver la figura 19

*** Ver la figura 20

**** Ver la figura 21

***** Ver la figura 22

En la tabla 5 se resalta que:

- **Resultaron como extractos no irritantes:** Extracto acuoso de cocona (I.I.: $0.00 < 0.5$), extracto acuoso de tumbo serrano (I.I.: $0.00 < 0.5$).

- **Resultaron como extractos irritantes leves:** Extracto acuoso de aguaymanto (I.I.: $4.38 < 0.5$), extracto glicólico de aguaymanto (I.I.: $3.62 < 0.5$), extracto acuoso de camu camu (I.I.: $4.38 < 0.5$), extracto acuoso de aguaje (I.I.: $4.26 < 0.5$), extracto hidroalcohólico de tumbo serrano (I.I.: $4.14 < 0.5$).
- **Resultaron como extractos irritantes moderados:** Extracto hidroalcohólico de aguaymanto (I.I.: $7.82 < 0.5$), extracto hidroalcohólico de camu camu (I.I.: $5.73 < 0.5$), extracto glicólico de camu camu (I.I.: $6.33 < 0.5$), extracto hidroalcohólico de aguaje (I.I.: $6.24 < 0.5$), extracto hidroalcohólico de cocona (I.I.: $6.54 < 0.5$), extracto glicólico de tumbo (I.I.: $7.15 < 0.5$).
- **Resultaron como extractos irritantes severos:** Extracto glicólico de aguaje (I.I.: $11.50 < 0.5$) y extracto glicólico de cocona (I.I.: $11.50 < 0.5$).

A continuación, se muestran las imágenes observadas en el microscopio óptico:

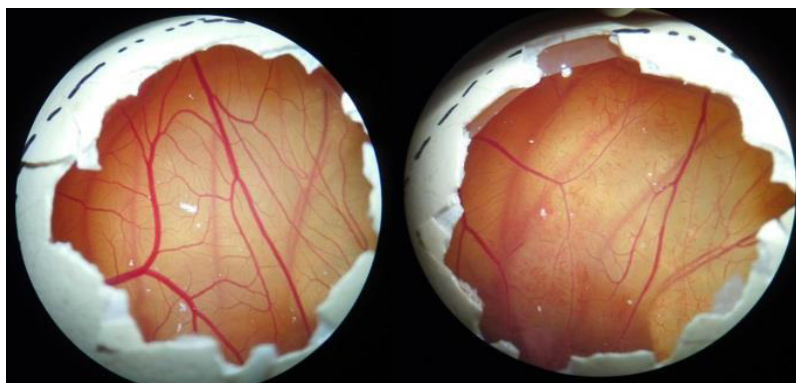


Figura 16. Evaluación del efecto del lauril sulfato de sodio 0.05N, en la CAM. Izquierda. Sin adición de sustancia. Derecha. Adición de lauril sulfato de sodio 0.05N, se observa lisis y coágulos.

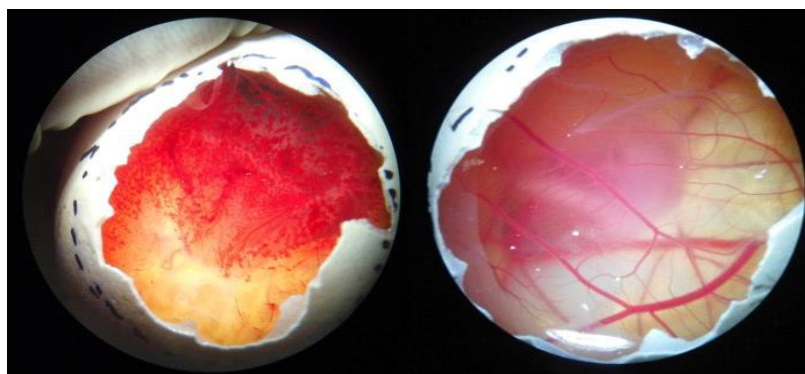


Figura 17. Evaluación del efecto del Hidróxido de sodio 0,1 N en la CAM. Izquierda. Sin adición de sustancia. Derecha. Adición de NaOH 0,1 N, se observa coágulos y hemorragia.



Figura 18. Evaluación del efecto del extracto glicólico de aguaymanto en la CAM. Izquierda. Sin adición de sustancia. Derecha. Adición del extracto, se observa hemorragia y lisis leve.

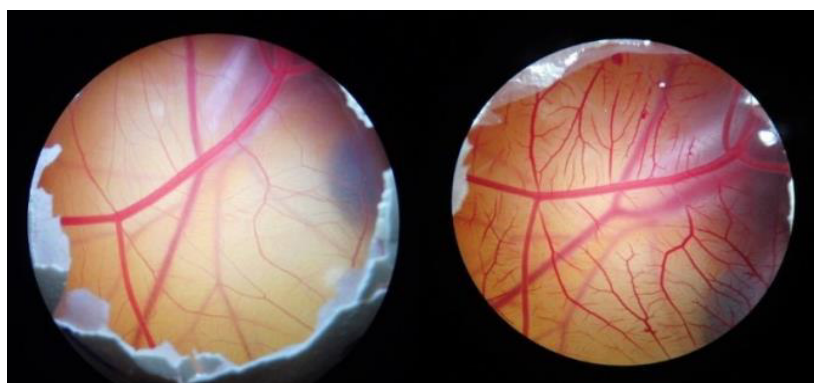


Figura 19. Evaluación del efecto del extracto glicólico de camu camu en la CAM. Izquierda. Sin adición de sustancia. Derecha. Adición del extracto, se observa hemorragia, lisis y coagulación moderada.

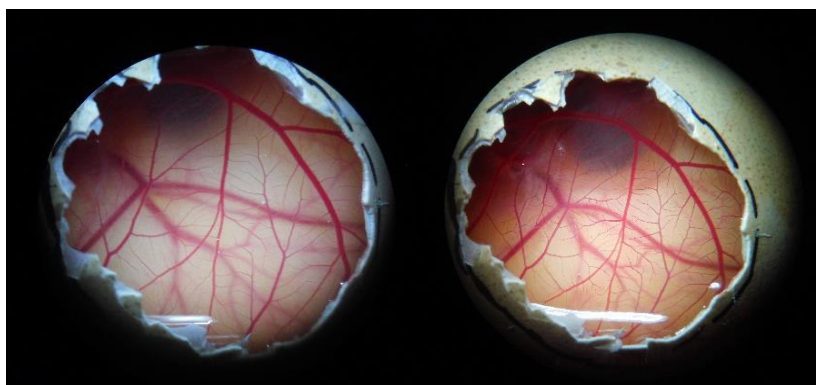


Figura 20. Evaluación del efecto del extracto glicólico de aguaje en la CAM. Izquierda. Sin adición de sustancia. Derecha. Adición del extracto, se observa lisis y coágulos.

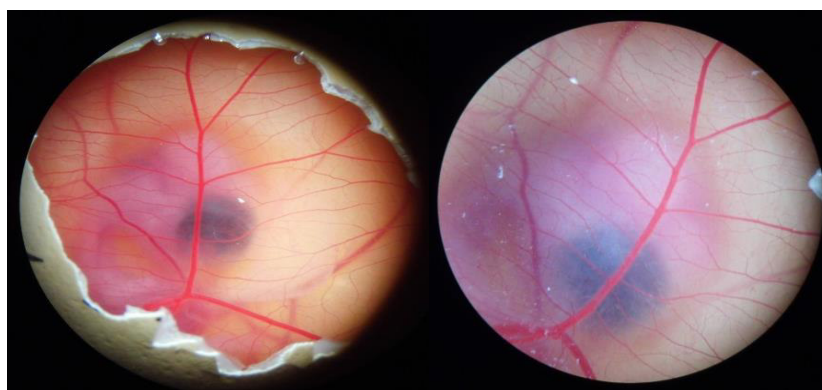


Figura 21. Evaluación del efecto del extracto hidroalcohólico de cocona en la CAM. Izquierda. Sin adición de sustancia. Derecha. Adición del extracto, se observa coágulos.



Figura 22. Evaluación del efecto del extracto hidroalcohólico de tumbo serrano en la membrana corioalantoidea. Izquierda. Sin adición de sustancia. Derecha. Adición del extracto, se observa lisis y coágulos.

4.2 Método de la CAM mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS)

Gráfico 2. Curva de calibración del colorante azul de tripán en formamida

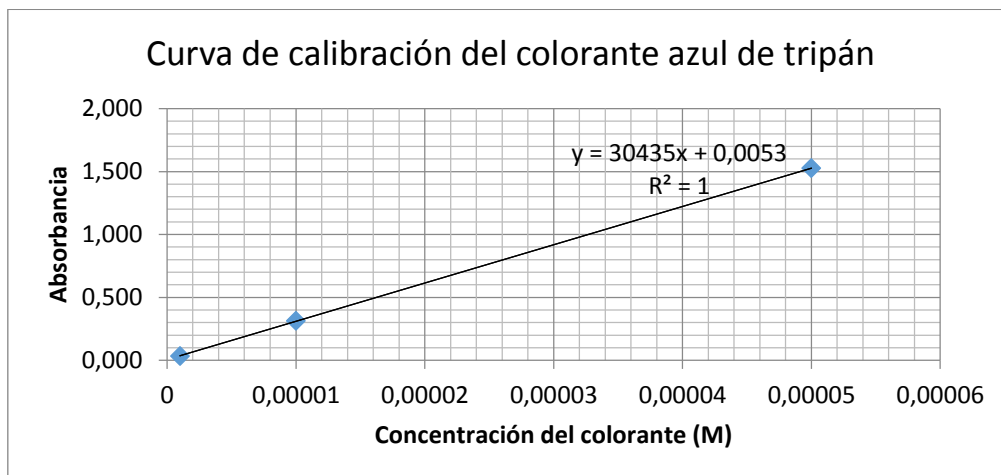


Tabla 6. Curva de calibración del colorante azul de tripán en formamida

CONCENTRACIÓN	ABSORBANCIAS			PROMEDIO ABS
5×10^{-5}	1,517	1,532	1,530	1,526
1×10^{-6}	0,312	0,315	0,313	0,313
1×10^{-7}	0,032	0,033	0,033	0,033
Ecuación de la recta: $y = 30435 X + 0,0053$				

Tabla 7. Resultados del método CAM-TBS de los controles del estudio

CONTROL	TIPO DE CONTROL*	PROMEDIO CANTIDAD COLORANTE	CLASIFICACIÓN
SUERO	BLANCO	$0,0213 \pm 0,0007$	NO IRRITANTE
LAURIL SULFATO DE SODIO	CONTROL POSITIVO 1	$0,1407 \pm 0,0124$	IRRITANTE MODERADO
HIDRÓXIDO DE SODIO	CONTROL POSITIVO 2	$0,2010 \pm 0,0607$	IRRITANTE SEVERO
ETANOL	SOLVENTE 1	$0,1101 \pm 0,0175$	IRRITANTE MODERADO
PROPILENGLICOL	SOLVENTE 2	$0,1427 \pm 0,0241$	IRRITANTE MODERADO

* 3 repeticiones

Tabla 8. Resultados del método CAM-TBS de los extractos

EXTRACTO	TIPO DE EXTRACTO	PROMEDIO CANTIDAD COLORANTE	CLASIFICACIÓN
AGUAYMANTO	ACUOSO	0,1371 \pm 0,0113	IRRITANTE MODERADO
	HIDROALCOHÓLICO	0,2616 \pm 0,0046	IRRITANTE SEVERO
	GLICÓLICO	0,1991 \pm 0,0476	IRRITANTE SEVERO
CAMU CAMU	ACUOSO	0,1991 \pm 0,0476	IRRITANTE SEVERO
	HIDROALCOHÓLICO	0,1661 \pm 0,0130	IRRITANTE SEVERO
	GLICÓLICO	0,3918 \pm 0,0147	IRRITANTE SEVERO
AGUAJE	ACUOSO	0,3271 \pm 0,0147	IRRITANTE SEVERO
	HIDROALCOHÓLICO	0,3080 \pm 0,0394	IRRITANTE SEVERO
	GLICÓLICO	0,0721 \pm 0,0462	NO IRRITANTE
COCONA	ACUOSO	0,0721 \pm 0,0462	NO IRRITANTE
	HIDROALCOHÓLICO	0,1971 \pm 0,0411	IRRITANTE SEVERO
	GLICÓLICO	0,2108 \pm 0,0176	IRRITANTE SEVERO
TUMBO SERRANO	ACUOSO	0,0960 \pm 0,0112	NO IRRITANTE
	HIDROALCOHÓLICO	0,1122 \pm 0,0233	IRRITANTE MODERADO
	GLICÓLICO	0,1784 \pm 0,0313	IRRITANTE SEVERO

* 3 repeticiones

En la tabla 8 se resalta que:

- **En los extractos no irritantes;** se observa una media del extracto glicólico de aguaje 0,0721 \pm 0,0462; extracto de cocona acuosa 0,0721 \pm 0,0462 y de extracto de tumbo acuoso 0,0960 \pm 0,0112. (Rango HET-CAM: 0-0,9).
- **En los extractos irritantes moderados;** se observa una media del extracto de aguaymanto acuoso 0,1371 \pm 0,0113 y de extracto de tumbo serrano hidroalcohólico 0,1122 \pm 0,0233. (Rango HET-CAM: 0-0,9).
- **En los extractos irritantes severos;** se observa una media del extracto hidroalcohólico de aguaymanto 0,2616 \pm 0,0046; extracto glicólico de aguaymanto 0,1991 \pm 0,0476; extracto acuoso de camu camu 0,1991 \pm 0,0476; extracto hidroalcohólico de camu camu 0,1661 \pm 0,0130; extracto

glicólico de camu camu $0,3918 \pm 0,0147$; extracto acuoso de aguaje $0,3271 \pm 0,0147$; extracto hidroalcohólico de aguaje $0,3080 \pm 0,0394$; extracto hidroalcohólico de cocona $0,1971 \pm 0,0411$; extracto glicólico de cocona $0,2108 \pm 0,0176$ y de extracto glicólico de tumbo $0,1784 \pm 0,0313$. (Rango HET-CAM: 0-0,9).

Los datos y resultados con mayor detalle se observa en el Anexo 6 (tablas 15-19)

4.3 Validación del método de la membrana corioalantoidea mediante tinción con azul de tripán (CAM-TBS)

4.3.1 Linealidad

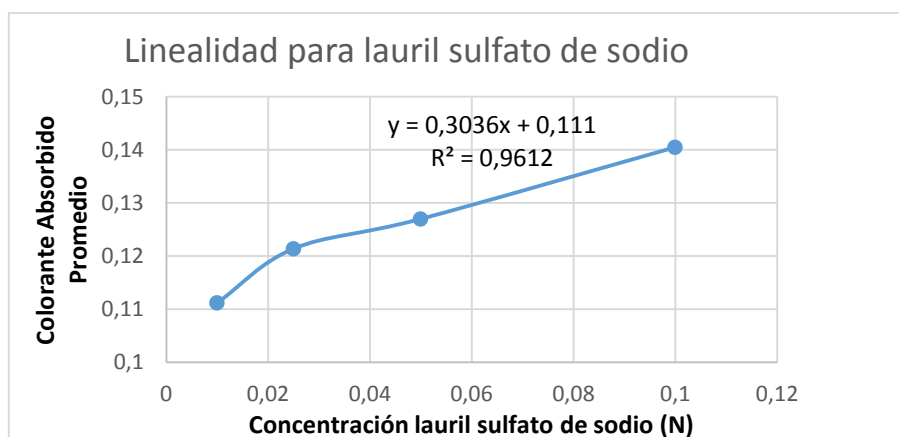
El coeficiente de correlación obtenido es el índice estadístico que mide la relación lineal entre estas dos variables.

Este índice indica que existe una dependencia total entre las dos variables denominada relación directa; es decir, cuando una de las variables aumenta la otra también lo hace en idéntica proporción [118]. Véase las tablas 9 y 10.

Tabla 9. Linealidad del control lauril sulfato de sodio (LSS)

CONCENTRACIÓN DE LSS	HUEVO Nº	CANTIDAD DE COLORANTE ABSORBIDO (nmoles/mg)	PROMEDIO CANTIDAD COLORANTE	COEFICIENTE DE VARIACIÓN	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN
SUERO	1	0,0221	0,0213 ± 0,0007	3,4958	0.9612
	2	0,0209			
	3	0,0208			
LSS 0.01N	1	0,1171	0,1112 ± 0,0064	5,8201	
	2	0,1043			
	3	0,1123			
LSS 0.025N	1	0,1127	0,1214 ± 0,0082	6,7819	
	2	0,1291			
	3	0,1224			
LSS 0.05N	1	0,1203	0,1270 ± 0,0151	11,9156	
	2	0,1443			
	3	0,1163			
LSS 0.1N	1	0,1338	0,1405 ± 0,0068	4,8681	
	2	0,1475			
	3	0,1404			

Gráfico 3. Linealidad para el control lauril sulfato de sodio

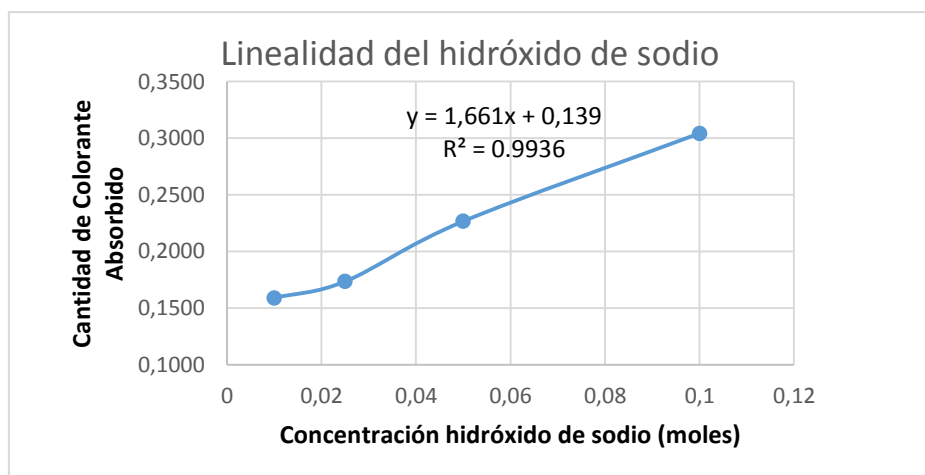


En la tabla 9 y en el gráfico 3 se resalta que existe alta correlación positiva y significativa entre x e y ($R=0.9612$), apreciándose que a mayor concentración de lauril sulfato de sodio, mayor colorante absorbido.

Tabla 10. Linealidad para el control hidróxido de sodio (NaOH)

CONCENTRACIÓN DE NaOH	HUEVO Nº	CANTIDAD DE COLORANTE ABSORBIDO	PROMEDIO CANTIDAD COLORANTE	COEFICIENTE DE VARIACIÓN	COEFICIENTE DE CORRELACIÓN
SUERO	1	0,0221	0,0213 ± 0,0007	3,4958	0,9936
	2	0,0209			
	3	0,0208			
NaOH 0.01N	1	0,1522	0,1589 ± 0,0076	4,7821	
	2	0,1672			
	3	0,1575			
NaOH 0.025N	1	0,1655	0,1734 ± 0,0069	3,9841	
	2	0,1779			
	3	0,1769			
NaOH 0.050N	1	0,2385	0,2266 ± 0,0105	4.6393	
	2	0,2225			
	3	0,2187			
NaOH 0.1N	1	0,2992	0,3042 ± 0,0177	5.8168	
	2	0,3239			
	3	0,2896			

Gráfico 4. Linealidad para el control hidróxido de sodio



En la tabla 10 se resalta que existe alta correlación positiva y significativa entre x e y ($R=0.9936$), apreciándose que a mayor concentración de hidróxido de sodio, mayor cantidad de colorante absorbido.

4.3.2 Precisión

4.3.2.1 Repetibilidad

La repetibilidad se evaluó en el laboratorio del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres.

Para cada extracto se realizaron 15 repeticiones con el fin de observar la desviación estándar y el coeficiente de variación en los resultados y verificar la dispersión que presentan los resultados.

La desviación estándar de cada uno de los extractos analizados nos indica que tan lejos se encuentra cada valor obtenido del valor promedio del colorante absorbido al ser realizado en diferentes condiciones (día, analista) con muestras idénticas.

Las desviaciones estándares que se obtuvieron fueron de valores pequeños lo que indicó que no se observa una diferencia significativa entre los datos para cada extracto.

El coeficiente de variación (CV) nos indica la relación existente entre la desviación de una muestra y su promedio. Al dividir la desviación típica por el promedio se convierte en un valor de unidad de medida.

El valor del CV en cada extracto evaluado para la repetibilidad no fue mayor al 10%.

Tabla 11. Prueba de Levene para evaluar la homogeneidad de varianza para los extractos acuosos

EXTRACTO	FRECUENCIA*	ESTADÍSTICO LEVENE	gl1	p
AGUAYMANTO ACUOSO	15	0,23	14	0,998+
CAMU CAMU ACUOSO	15	0,23	14	0,998+
AGUAJE ACUOSO	15	0,27	14	0,994+
COCONA ACUOSO	15	0,18	14	0,999+
TUMBO SERRANO ACUOSO	15	0,23	14	0,998+

*Se consideró 15 repeticiones por cada extracto

En la tabla 11 se resalta que:

- Con el extracto de aguaymanto acuoso existe igualdad de varianza en las 15 muestras $p=0,998>0,05$
- Con el extracto de camu camu acuoso existe igualdad de varianza en las 15 muestras $p=0,998>0,05$
- Con el extracto de aguaje acuoso, existe igualdad de varianza en las 15 muestras $p=0,994>0,05$
- Con el extracto de cocona acuoso existe igualdad de varianza en las 15 muestras $p=0,999>0,05$
- Con el extracto de tumbo serrano acuoso existe igualdad de varianza en las 15 muestras $p=0,998>0,05$

Los datos y resultados con mayor detalle se observa en el Anexo 7 (tablas 20-24)

4.3.2.2 Reproducibilidad

La reproducibilidad se evaluó en el laboratorio del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina Humana-USMP. Se evaluó la reproducibilidad con dos analistas y en dos días, por triplicado.

La desviación estándar obtenida en los análisis de reproducibilidad para todos los extractos, es relativamente pequeña indicando que existe una agrupación de datos muy cercanos alrededor de la media.

El coeficiente de variación (CV) en cada una de los grupos de datos para la reproducibilidad no fue mayor al 10%. En los análisis a continuación mostrados, se observa que para el día 1 y con el promedio de los analistas 1 y 2, el CV más bajo se presentó en el extracto de camu camu acuoso 1,1419 y que el CV más alto se presentó en el extracto de cocona acuoso 6,1768, ambos resultados se encuentran dentro de los criterios de aceptación.

Se determinó la prueba t de Student. Véase la tabla 12.

Tabla 12. Evaluación de la reproducibilidad, según parámetro de analista, en un sólo día de análisis

EXTRACTO	ANALISTAS	N	MEDIA+	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	p
AGUAYMANTO ACUOSO	ANALISTA 1	3	0,1268	0,0018	0,325
	ANALISTA 2	3	0,1252	0,0019	
CAMU CAMU ACUOSO	ANALISTA 1	3	0,1848	0,0017	0,131
	ANALISTA 2	3	0,1874	0,0018	
AGUAJE ACUOSO	ANALISTA 1	3	0,3606	0,0059	0,002*
	ANALISTA 2	3	0,3884	0,0034	
COCONA ACUOSO	ANALISTA 1	3	0,0663	0,0043	0,763
	ANALISTA 2	3	0,0675	0,0048	
TUMBO SERRANO ACUOSO	ANALISTA 1	3	0,0980	0,0039	0,810
	ANALISTA 2	3	0,0991	0,0066	
	ANALISTA 2	3	0,0984	0,0057	

+Prueba t de Student, *p<0,05 existe diferencias significativas

En la tabla 12 se resalta que:

- La media del analista 1 es $0,3606 \pm 0,0059$ y la media del analista 2 es 0.3884 ± 0.0034 . En el extracto de aguaje acuoso se encontró un $p < 0,05$, es decir existen diferencias significativas entre los resultados de los analistas 1 y 2, observándose mayor media significativamente en el analista 2.
- En los demás extractos analizados se encontró un $p \geq 0,05$, es decir no existen diferencias significativas entre los resultados de los analistas 1 y 2 para cada extracto.

Los datos y resultados con mayor detalle se observa en el anexo 8 (tabla 25)

4.3.3 Robustez

Teniendo en consideración que la robustez se evaluó en dos ambientes distintos, el laboratorio del Centro de Investigación de Bioquímica y Nutrición de la Facultad de Medicina Humana de la Universidad de San Martín de Porres (USMP) y la empresa Ingenioidea SAC.

Para este parámetro se trabajaron las siguientes condiciones: incubadoras artesanales, huevos incubados hasta el noveno día de fecundización, diferentes analistas, además todos los reactivos que se utilizaron fueron los mismos que se preparó para todas las pruebas anteriores.

La desviación estándar obtenida para cada extracto en el análisis de la robustez del método es relativamente pequeña indicando que existe una agrupación de datos muy cercanos alrededor de la media.

El coeficiente de variación (CV) obtenido para cada extracto en la robustez del método no fue mayor al 10%. Se determinó la prueba t de Student. Véase la tabla 13.

Tabla 13. Evaluación de la robustez, según parámetro de lugar de análisis

EXTRACTOS	LUGARES	N	MEDIA+	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	p
AGUAYMANTO ACUOSO	USMP	9	0,1274	0,0019	0,000*
	INGENIOIDEA	9	0,1347	0,0015	
CAMU CAMU ACUOSO	USMP	9	0,1953	0,0019	0,10
	INGENIOIDEA	9	0,1967	0,0016	
AGUAJE ACUOSO	USMP	9	0,3808	0,0044	0,000*
	INGENIOIDEA	9	0,3958	0,0025	
COCONA ACUOSO	USMP	9	0,0646	0,0027	0,000*
	INGENIOIDEA	9	0,0748	0,0018	
TUMBO SERRANO ACUOSO	USMP	9	0,0959	0,0017	0,000*
	INGENIOIDEA	9	0,0919	0,0005	
	INGENIOIDEA	9	0,0943	0,0014	

+Prueba t de Student, *p<0.05 existe diferencias significativas

En la tabla 13 se resalta que:

- La media del extracto acuoso de aguaymanto en USMP ($0,1274 \pm 0,0019$) es menor que la media del extracto de aguaymanto acuoso en Ingenioidea ($0,1347 \pm 0,0015$). Además se observa $p=0,000^*$ ($p<0,05$) por lo cual existen diferencias significativas entre ambos resultados.
- La media del extracto acuoso de aguaje en USMP ($0,3808 \pm 0,0044$) es menor que la media del extracto de aguaje acuoso en Ingenioidea ($0,3958 \pm 0,0025$). Además se observa $p=0,000^*$ ($p<0,05$) por lo cual existen diferencias significativas entre ambos resultados.
- La media del extracto acuoso de cocona en USMP ($0,0646 \pm 0,0027$) es menor que la media del extracto de cocona acuoso en Ingenioidea ($0,0748 \pm 0,0018$). Además se observa $p=0,000^*$ ($p<0,05$) por lo cual existen diferencias significativas entre ambos resultados.

- La media del extracto acuoso de tumbo serrano en USMP ($0,0959 \pm 0,0017$) es mayor que la media del extracto de tumbo serrano acuoso en Ingenioidea ($0,0919 \pm 0,0005$). Además se observa $p=0,000^*$ ($p<0,05$) por lo cual existen diferencias significativas entre ambos resultados.
- La media del extracto acuoso de camu camu en USMP ($0,1953 \pm 0,0019$) es menor que la media del extracto de camu camu acuoso en Ingenioidea ($0,1967 \pm 0,0016$). Además se observa $p=0,10$ ($p\geq 0,05$) por lo cual no existen diferencias significativas entre ambos resultados.

Los datos y resultados con mayor detalle se observa en el anexo 9 (Tabla 26)

4.3.4 Exactitud

La exactitud es la capacidad que tiene el método para generar mediciones que se acerquen al valor verdadero, por esta razón se analizan tres concentraciones diferentes de hidróxido de sodio por el método de adición del patrón para observar su porcentaje (%) de recuperación en cada una de ellas. Véase la tabla 14.

Tabla 14. Evaluación de la exactitud, mediante el porcentaje de recuperación y la correlación de Pearson

CONCENTRACIONES CORREGIDAS DE EXTRACTOS	PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN (%)	
AGUAYMANTO ACUOSO	Correlación de Pearson (R)	0,998
	p	0,04
	N	3
CAMU CAMU ACUOSO	Correlación de Pearson (R)	0,99
	p	0,07
	N	3,00
AGUAJE ACUOSO	Correlación de Pearson (R)	0,98
	p	0,11
	N	3
COCONA ACUOSO	Correlación de Pearson (R)	0,97
	p	0,15
	N	3
TUMBO SERRANO ACUOSO	Correlación de Pearson (R)	0,97
	p	0,15
	N	3

***La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).**

En la tabla 14 se resalta que:

- El extracto acuoso de aguaymanto tiene una alta correlación positiva y existen diferencias significativas entre la concentración y el porcentaje de recuperación ($R=0,998$; $p=0,04<0,05$).
- El extracto acuoso de camu camu tiene una alta correlación positiva y no existen diferencias significativas entre la concentración y el porcentaje de recuperación ($R=0,99$; $p=0,07\geq 0,05$).

- El extracto acuoso de aguaje tiene una alta correlación positiva y no existen diferencias significativas entre la concentración y el porcentaje de recuperación ($R=0,98$; $p=0,11 \geq 0,05$).
- El extracto acuoso de cocona tiene una alta correlación positiva y no existen diferencias significativas entre la concentración y el porcentaje de recuperación ($R=0,97$; $p=0,15 \geq 0,05$).
- El extracto acuoso de tumbo serrano tiene una alta correlación positiva y no existen diferencias significativas entre la concentración y el porcentaje de recuperación ($R=0,97$; $p=0,15 \geq 0,05$).

Los datos y resultados con mayor detalle se observa en el anexo 10 (tablas 27-37)

V. DISCUSIÓN

- El método HET CAM, se basa en cambios macroscópicos producido en la membrana corioalantoidea del huevo de gallina, como son la hemorragia, lisis y coagulación. Este método es de carácter subjetivo, por lo que se complementa con el método HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS), utilizando el colorante azul de tripán, como un medio de contraste para distinguir células vivas y muertas. En este método, se cuantifica la cantidad de azul de tripán absorbida por la membrana corioalantoidea dañada.
- Debido a que el extracto acuoso de aguaje tiene componentes hidrosolubles y liposolubles los cuales pueden generar distorsión en los resultados obtenidos debido a que la extracción puede obtener ambos componentes. Al enfriar el extracto se forma dos fases lipo /acuoso, por lo cual estos componentes de ambas fases podrían interaccionar con el colorante azul de tripán.
- Otro factor que afecta son los analistas; el analista 1 es la tesista y el analista 2 es un profesional biólogo de la Universidad San Martín de Porres al cual la tesista le explicó el método a seguir.
- La temperatura de la incubación de los huevos, también puede afectar a los resultados obtenido en la evaluación de la robustez debido a que en la empresa Ingenioidea SAC se construyó una incubadora provisional controlando mejor los parámetros para una adecuada incubación de los huevos y así desarrollar el método CAM-TBS, a diferencia de la incubadora usada en la Universidad San Martín de Porres en el cual se tuvo que acondicionar el material posible para construir una incubadora provisional, adecuándose a las circunstancias.
- La diferencia entre los resultados obtenidos en la robustez puede deberse a la logística del transporte de los huevos a pesar que se acondicionó en

cajas de tecnopor. La proveedora de los huevos fértiles quedaba ubicada en el distrito de Chorrillos, departamento de Lima, la duración del traslado fue alrededor de 90 minutos a la Universidad de San Martín de Porres y 120 minutos a la empresa Ingenioidea SAC, esto generó un aumento o disminución de la irritabilidad del NaOH. Además, la diferencia entre los resultados obtenidos en la robustez también puede indicar que el proceso de extracción no fue efectivo en las condiciones de trabajo establecidas. Esto puede deberse también a interferencias propias de cada planta analizada y que una pequeña variación a estas concentraciones bajas implica un cambio alto en la lectura debido a una alta sensibilidad de la determinación.

- En relación a la precisión, los resultados del porcentaje de recuperación (%) se muestra debajo del 100 % por el cual puede deberse a que el extracto podría tener capacidad protectora frente a la irritación.

VI. CONCLUSIONES

- Se elaboró los extractos acuosos, glicólicos e hidroalcohólicos de *Physalis peruviana* L. (aguaymanto), *Myrciaria dubia* L. (camu camu), *Mauritia flexuosa* L. (aguaje), *Solanum sessiliflorum* D. (cocona) y *Passiflora mollissima* HBK (tumbo serrano).
- Se estandarizó la prueba de irritabilidad ocular *in vitro*, mediante los métodos HET-CAM cualitativo y método HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) en los extractos acuosos, hidroalcohólicos y glicólicos de *Physalis peruviana* L. (aguaymanto), *Myrciaria dubia* L. (camu camu), *Mauritia flexuosa* L. (aguaje), *Solanum sessiliflorum* D. (cocona) y *Passiflora mollissima* HBK (tumbo serrano).
- Se validó la prueba de irritabilidad ocular *in vitro*, mediante el método HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) en los extractos acuosos de *Physalis peruviana* L. (aguaymanto), *Myrciaria dubia* L. (camu camu), *Mauritia flexuosa* L. (aguaje), *Solanum sessiliflorum* D. (cocona) y *Passiflora mollissima* HBK (tumbo serrano).
- La validación de la prueba de irritabilidad ocular *in vitro*, mediante el método HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) en los extractos acuosos de *Physalis peruviana* L. (aguaymanto), *Myrciaria dubia* L. (camu camu), *Mauritia flexuosa* L. (aguaje), *Solanum sessiliflorum* D. (cocona) y *Passiflora mollissima* HBK (tumbo serrano) resultó lineal, exacto y preciso.
- La validación de la prueba de irritabilidad ocular *in vitro*, mediante el método HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) en los extractos acuosos de *Physalis peruviana* L. (aguaymanto), *Myrciaria dubia* L. (camu camu), *Mauritia flexuosa* L. (aguaje), *Solanum sessiliflorum* D. (cocona) y *Passiflora mollissima* HBK (tumbo serrano) no resultó robusto a nivel de inter-laboratorios.

VII. RECOMENDACIONES

- Tal como se detalla en la presente investigación, diversos estudios han señalado la alta correlación entre los resultados alcanzados entre el método alternativo HET-CAM cualitativo, el método HET-CAM cuantitativo (CAM-TBS) y las pruebas *in vivo*, por el método de Draize. Por lo que se recomienda seguir realizando estudios para la aceptación como aval de seguridad para los productos cosméticos.
- Para las posteriores validaciones, en la evaluación de la robustez, ya se tiene sustento de los parámetros críticos que afectaron en esta investigación entre ellos el periodo de fecundación, la temperatura, el cuidado y acondicionamiento de los huevos, con el fin de optimizar los resultados de futuros estudios a partir de este estudio de investigación.
- Se recomienda continuar con los estudios de irritabilidad de otros extractos vegetales que se utilizan en dermocosmética y cosmética del cabello y anexos.
- Se debe comparar los resultados con análisis histopatológicos de la membrana corioalantoidea.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Inocente M.; Toscano E.; Castañeda B. Efecto irritante *in vitro* de formulaciones cosméticas con extracto de camu camu, mediante el método HET-CAM. *Horizonte Medico* 2013; 13 (2):12-18.
2. Guía para Evaluación de la Seguridad de Productos Cosméticos. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria. [en línea] Brazilia 2003 [acceso 07 de julio del 2015]. Disponible en: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a546f480486402b78e168f2bd5b3ccf0/guia_cosmeticos_espanol.pdf?MOD=AJPERES
3. Draize J.; Woodard G.; Calvery H. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J Pharmacol Experim Therapeutics* 1944; 22: 372-90.
4. OECD Guideline for Testing of Chemicals: Guideline No. 405: acute eye irritation/corrosion. OECD Publication Office. [en línea] París 1987 [acceso 07 de julio del 2015]. Disponible en: <http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd-tg405-2012-508.pdf>
5. International Organization for Standardization. Draft international standard ISO/DIS 10993-10. *Biol Eval Med Devices* 1992; 5: 44-7.
6. Casterton P.; Potts L.; Klein B. A novel approach to assessing eye irritation potential using the bovine corneal opacity and permeability assay. *Journal of Toxicology / Cutaneous and ocular toxicology* 1996; 15(2): 147-163.
7. Worth A.; Balls M. Alternative (non-animal) methods for chemicals testing: current status and future prospects. A report prepared by ECVAM and the ECVAM working group on chemicals. *ATLA* 2002; 30(1): 1-115.
8. Prinsen M. The chicken enucleated eye test (CEET): a practical (pre)screen for the assessment of eye irritation/corrosion potential of test materials. *Food and Chemical Toxicology* 1996; 34: 291-296.
9. Prinsen M.; Koëter H. Justification of the enucleated eye test with eyes of slaughterhouse animals as an alternative to the Draize eye irritation test with rabbits. *Food and Chemical Toxicology* 1993; 31: 69-76.
10. Southee J.; McPherson J.; Osborne R.; Carr G.; Rasmussen E. The performance of the tissue equivalent assay using the Skin2™ ZK1200 model in the COLIPA International Validation Study on Alternatives to the Draize Eye Irritation Test. *Toxicology in vitro* 1991; 13: 355-373.

11. Nguyen D.; Beuerman R.; De Weber B.; Rosdy M. Three-dimensional construct of the human corneal epithelium for *in vitro* toxicology. In Salem H.; Katz S., editors. *Alternative Methods for the new millennium*. Florida CRC Press. 2001; Chapter 14. p. 145-157.
12. Brinch D.; Elvig S. Evaluation of an *in vitro* human corneal model as alternative to the *in vivo* eye irritation testing of enzymes. *Toxicology Letters* 2001; 123 (suppl) 1: 22.
13. Martínez V. Marcadores de irritación en modelos celulares y organotípicos como alternativa a los ensayos in vivo, aplicado al estudio de tensioactivos de tipo lipoaminoácido [tesis doctoral]. Barcelona: Universidad de Barcelona; 2007.
14. Borenfreund E.; Puerner J. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). *Journal of Tissue Culture Methods* 1984; 9: 7-9.
15. Clothier R. ECVAM SIS Database. Ispra, Italia: ECVAM, European Commission Joint Research Centre. The FRAME Modified Neutral Red Uptake Cytotoxicity Test. *Invitox Protocol* 3. 1990.
16. Spielmann H. ECVAM SIS Database. Ispra, Italia: ECVAM, European Commission Joint Research Centre. BALB/c 3T3 Cytotoxicity Test. *Invitox Protocol* 46. 1992b.
17. Harbell J. ECVAM SIS Database. Ispra, Italia: ECVAM, European Commission Joint Research Centre. Neutral Red Bioassay Using BALB/c 3T3 Cells. *Invitox Protocol* 100. 1994.
18. Clothier R. ECVAM SIS Database. Ispra, Italia: ECVAM, European Commission Joint Research Centre. The FRAME neutral red release assay. *Invitox Protocol* 54. 1992.
19. Zuang V. The neutral red release assay: a review. *ATLA* 2011; 29: 575-599.
20. Muir C.; Flower C.; Abb N. A novel approach to the search for *in vitro* alternatives to *in vivo* eye irritancy testing. *Toxicology letters* 1983; 18: 1-5.
21. Pape W.; Pfannenbecker U.; Hoppe U. Validation of the red blood cell test system as *in vitro* assay for the rapid screening of irritation potential of surfactants. *Molecular Toxicology* 1990; 1: 525-536.
22. Lewis W. ECVAM SIS Database. Ispra, Italy: ECVAM, European Commission Joint Research Centre. Red Blood Cell Lysis and Protein Denaturation. *Invitox Protocol* 99. 1994.

23. Pape W.; Pfannenbecker U. ECVAM SIS Database. Ispra, Italy: ECVAM, European Commission Joint Research Centre. The Red Blood Cell Test System. *Invitox Protocol* 37. 1992.
24. Rhoads L.; Cook J.; Patrone L.; Buskirk R. A human epidermal model can be assayed employing a multiple fluorescent endpoint assay and the Cytofluor 2300. *Journal of Toxicology / Cutaneous and Ocular Toxicology* 1993; 12: 87-102.
25. Cottin M.; Zanvit A. Fluorescein leakage test: a useful tool in ocular safety assessment. *Toxicology in vitro* 1997; 11: 399-405.
26. Shaw A.; Clothier R.; Balls M. 1990. Loss of trans-epithelial impermeability of a confluent monolayer of Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) cells as a determinant of ocular irritancy potential. *ATLA* 1990; 18: 145-151.
27. Bruner L.; Miller K.; Owicki J.; Parce J.; Muir V. Testing ocular irritancy *in vitro* with the silicon microphysiometer. *Toxicology in vitro* 1991; 5: 277-284.
28. McConnell H.; Owicki J.; Parce J.; Miller D.; Baxter G.; Wada H.; et al. The cytosensor microphysiometer: biological applications of silicon technology. *Science* 1992; 257: 1906-1912.
29. Catroux P.; Rougier A.; Dossou K.; Cottin M. The silicon microphysiometer for testing ocular toxicity *in vitro*. *Toxicology in vitro* 1993; 7: 465-469.
30. Harbell J.; Osborne R.; Carr G.; Peterson A. Assessment of the cytosensor microphysiometer assay in the COLIPA *in vitro* eye irritation validation study. *Toxicology in vitro* 1999; 13: 313-323.
31. Kelly C. Eyetex: an *in vitro* method of predicting ocular safety. *Pharmacopeial Forum* 1989; 15: 4815-4824.
32. Cronin M.; Basketter D.; York M. A quantitative structure-activity relationship (QSAR) investigation of a Draize eye irritation database. *Toxicology in vitro* 1994; 8: 21-28.
33. Abraham M.; Kumarsingh R.; Cometto-Muniz J.; Cain W. A quantitative structure-activity relationship (QSAR) for a Draize eye irritation database. *Toxicology in vitro* 1998; 12: 201-207.
34. Abraham M.; Hassanisadi M.; Jalali-Heravi M.; Ghafourian T.; Cain W.; Cometto-Muniz J. Draize rabbit eye test compatibility with eye irritation thresholds in humans: a quantitative structure-activity relationship analysis. *Toxicological Sciences* 2003; 76: 384-392.

35. Cronin M.; Dearden J.; Walker J.; Worth A. Quantitative structure-activity relationships for human health effects: commonalities with other endpoints. *Environmental and Toxicological Chemistry* 2003; 22: 1829-1843.
36. Hulzebos E.; Maslankiewicz L.; Walker J. Verification of literature-derived SARs for skin irritation and corrosion. *QSAR & Combinatorial Science* 2003; 22: 351-363.
37. Patlewicz G.; Rodford R.; Walker J. QSARs for predicting skin and eye irritation. *Environmental and Toxicological Chemistry* 2013; 22: 1862-1869.
38. Lüpke N. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Fd Chem Toxic* 1985; 23: 287-291.
39. Spielmann H. The Ergatt/Frame, data bank of *in vitro* techniques in toxicology. *HET-CAM Test*. (Invitox Protocol 47) 1992: 1-9.
40. Steiling W. The Ergatt/Frame, data bank of *in vitro* techniques in toxicology. The hen's egg test on the chorioallantoic membrane. (Invitox Protocol 96) 1994: 1-23.
41. Itagaki H., Hagino S.; Kato S. The Ergatt/Frame, data bank of *in vitro* techniques in toxicology. CAM-TBS test. (Invitox Protocol 108). 1995:1-6.
42. Balls M.; Berg N.; Bruner L.; Curren R.; de Silva O.; Earl L.; et al. Eye irritation testing: the way forward. The report and recommendations of ECVAM workshop 34. *ATLA* 1999; 27: 53-77.
43. Knight D.; Breheny D. Alternatives to animal testing in the safety evaluation of products. *ATLA* 2002; 30:7-22.
44. Eskes C.; Bessou S.; Bruner L.; et al. Subchapter 3.3. Eye Irritation. In: Eskes C, Zuang V, eds. Alternative (non-animal) Methods for Cosmetics Testing: Current Status and Future Prospects. *ATLA* 2005; 33(1):47-81.
45. Leighton J.; Nassauer J.; Tchao R. The chick embryo in toxicology: an alternative to the rabbit eye. *Food and chemical toxicology* 1985; 23(2): 293-298.
46. Bagley D.; Kong B.; Desalva S. Assessing the eye irritation potential of surfactant-based materials using the chorioallantoic membrane vascular assay (CAMVA). In: Goldberg A., editors: Alternative methods in toxicology, Vol 7. New York: Mary Ann Liebert, Inc.; 1989. p. 265-272.

47. Bagley D.; Rizvi P.; Kong B.; Salva S. Factors affecting use of the hens egg chorioallantoic membrane as a model for predicting eye irritation potential.; *Journal of toxicology/Cutaneous and ocular toxicology* 1991; 10: 95-104.
48. Bagley D.; Bruner L.; De Silva O.; Cottin M.; O'Brien K.; Uttley M.; et al. An evaluation of five potential alternatives *in vitro* to the rabbit eye irritation test *in vivo*. *Toxicology in vitro* 1992; 6: 136-149.
49. Bagley D.; Waters D.; Kong B. Development of a 10-day chorioallantoic membrane vascular assay as an alternative to the Draize rabbit eye irritation test. *Food and Chemical Toxicology* 1994; 33 (12):1155-1160.
50. Hagino S.; Itagaki H.; Kato S.; Kobayashi T.; Tanaka M. Quantitative evaluation to predict the eye irritancy of chemicals: modification of chorioallantoic membrane test by using Trypan Blue. *Toxicology In vitro* 1991; 5: 301-304.
51. Hagino S.; Itagaki H.; Kato S.; Kobayashi T. Further evaluation of the quantitative chorioallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of chemicals. *Toxicology in vitro*. 1993; 7: 35-39.
52. Hagino S.; Kinoshita S.; Tani N.; Nakamura T.; Ono N.; Konishi K.; et al. Interlaboratory validation of *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (2) Chorioallantoic membrane (CAM) test.; *Toxicology in vitro* 1999; 13(1); 99-113.
53. Rougier A.; Cottin M.; De Silva O.; Catroux P.; Roguet R.; Dossou KG.; et al. The use of *in vitro* methods in the ocular irritation assessment of cosmetic products. *Toxicology In vitro*. 1994; 8: 893-905.
54. Spielmann H. Ocular irritation. *In vitro* methods in pharmaceutical research. Castell J. and Gomez-Lechon M. editors. Academic Press; 1997. p. 265-287.
55. Steiling W.; Brachter M.; Coutellemont P.; De Silva O. The HET-CAM, a useful *in vitro* assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. *Toxicology in vitro* 1999; 13: 375-384.
56. Balls M.; Brantom P.; Cassidy S.; Esdaile D.; Fentem J.; Liebsch M.; et al. Preliminary evaluation of the application of reference standards in the prevalidation and validation of *in vitro* test for eye irritation. In: DG Clark, SG Lisansky and R Macmillan: Alternatives to animal testing II, proceedings, Brussels: CPL Press; 1999. p. 201-204.

57. Brantom P.; Bruner L.; Chamberlain M.; De Silva O.; Dupuis J.; Earl L.; et al. A Summary Report of the COLIPA International Validation Study on Alternatives to the Draize Rabbit Eye Irritation Test. *Toxicology in vitro* 1997; 11: 141 – 179.
58. Bagley D.; Cervin D.; Harbell J. Assessment of the chorioallantoic membrane vascular assay (CAMVA) in the COLIPA *in vitro* eye irritation validation study. *Toxicology in vitro* 1999; 13: 285-293.
59. Gettings S.; Lordo R.; Hintze K.; Bagley D.; Casterton P.; Chudkowski M.; et al. The CTFA evaluation of alternatives program: an evaluation of *in vitro* alternatives to the Draize primary eye irritation test (Phase III) Surfactant-based formulations. *Food and Chemical Toxicology* 1996; 34: 79-117.
60. Cerven D.; Moreno O. Bovine corneal opacity and permeability test validation as an alternative to the Draize eye irritation assay. In: Salem H.; Katz S., editors: Adv Anim Altern Saf Efficacy Test. Taylor & Francis, Washington, D.C; 1998. p. 261-267.
61. Ohno Y.; Kaneko T.; Inoue T.; Morikawa Y.; Yoshida T.; Fuji A.; et al. Interlaboratory validation of the *in vitro* eye irritation tests for cosmetic ingredients. (1) Overview of the validation study and Draize scores for the evaluation of the tests; *Toxicology in vitro* 1999; 13(1): 73-98.
62. Repetto G.; del Peso A.; Zurita J. Métodos Alternativos a la Experimentación Animal en la Evaluación de la Seguridad. En: *Toxicología Ambiental: Seguridad Química*. Elche (Alicante): Asociación Española de Toxicología. 2004.
63. Balls M.; Blaauboer B.; Fentem J.; Bruner L.; Combes R.; Ekwall B.; et al. Practical aspects of the validation of toxicity tests procedures. ECVAM Workshop Report 5. *ATLA* 1995; 23: 129-147.
64. Repetto G.; Repetto M. Métodos Alternativos: Estudios Toxicológicos *in vitro*. Capítulo 2. En: Repetto M., editor. *Toxicología Avanzada*. Díaz de Santos (Barcelona); 1995. p. 37-59.
65. Spielmann H.; Liebsch M. Lessons learned from validation of *in vitro* toxicity test: From failure to acceptance into regulatory practice. *Toxicology in vitro* 2001; 15: 585-590.
66. Eye Irritation/ Corrosion. Non- animal Methods for Toxicity Testing. [en línea]. 2015 [acceso 07 de julio del 2015]. Disponible en: <http://alttox.org/mapp/toxicity-endpoints-tests/eye-irritationcorrosion/>

67. Journal Officiel de la Republique Francaise. Arrete du 29 Novembre 1996 relatif aux methodes officielles d' analys e necessaires aux controles des produits cosmetiques. *Journal Officiel de la Republique Francaise* 1996: 19137-19138.
68. Schlede E.; Gerner I. The Draize eye test and progress in development and acceptance of alternatives to this test in Europe. In: Goldberg A.; Van Zutphen L., editors. *The World Congress on Alternatives and Animals Use in the Life Sciences: Education, Research, Testing*. Mary Ann Liebert, Inc., New York; 1995. p. 333-336.
69. Spielmann H. Target 2000 - case studies - chemicals testing - reducing animal experiments by 50 %. Proceedings conference 14 and 15 April 1997, Brussels. Ideal Conferences, London, UK 1998. p. 1-12.
70. Flores S. Cultivo de Frutales Nativos Amazónicos. Manual para el extensionista. Lima: Mirigraf S.R.L.; 1997. p. 7-14.
71. Correa S.; Aldana M. Tecnología para la producción de camu camu *Myrciaria dubia* (H.B.K) Mc Vaugh. 1ra edición, Lima: 2007. p. 7- 44.
72. Garcia-Quiroz A.; Moreira S.; De Moraes A.; Silva A.; Da Rocha G. Alcantara P. Physical and chemical analysis of dielectric properties and differential scanning calorimetry techniques on buriti oil. *Instrum. Sci. Technol* 2003; 31: 93-101.
73. Vásquez P.; Sotero V.; Del Castillo D.; Freitas L.; Maco M. Diferenciación química de tres morfotipos de *Mauritia flexuosa* L. f, de la Amazonía peruana, *Rev Soc Quím Perú* 2009; 75(3): 320-328.
74. Costa P. Fatty acids, tocopherols and phytosterols characterization in north/northeast fruits in Brazil. [DoctorateThesis] Faculdade de Engenharia de Alimentos. UNICAMP; 2007.
75. Correa S. Cultivo de camu camu *Myrciaria dubia* H.B.K. en la región de Loreto. 1ra edición, Lima: 2001. p. 9 – 30.
76. Torres V. Determinación del potencial nutritivo y funcional de Guayaba (*Psidium guajava* L.), cocona (*Solanum sessiliflorum* Dunal) y camu camu (*Myrciaria dubia* Vaugh). [Tesis para optar el título de Ingeniera Agroindustrial] Escuela politécnica Nacional Quito; 2010.
77. Taira F. Desde la Amazonia: La demanda del camu camu, [en línea] 2006 [acceso 07 de julio del 2015] Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos34/demanda-camu-camu/demanda-camu-camu.shtml>

78. Da Silva D. Cocona (*Solanum sessiflorum* Dunal): Cultivo y Utilización. Tratado de Cooperacion Amazonica. Caracas, Venezuela 1998; p 9 – 94.
79. CORPEI. Naranjillas, Pitahaya, Arazá y Borojó con Agroquímicos. Ecuador: 2005,
80. Hernández M.; Barrera J. Bases técnicas para el aprovechamiento agroindustrial de especies nativas de la amazonia. 1 ed. Bogotá: Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas, SINCHI; 2004. p 70-92.
81. Gallozi R.; Duarte O. Cultivos de diversificación para pequeños productores de frijol y maíz en América Central: naranjilla (lulo) y cocona. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José, Costa Rica. 2007.
82. Repo-Carrasco R. Caracterización y usos de frutas nativas: aguaymanto (*Physalis peruviana*), tomate de árbol (*Yphomandra betacea*), papaya arequipeña (*Arica pubescens*) y tuna (*Opuntia ficus indica*). Universidad San Ignacio de Loyola, Perú.
83. Wu S.; Huang Y.; Lin D.; Wang S. Antioxidant activities of *Physalis peruviana* L. *Biol Pharm Bull* 2005; 28(6): 963- 966.
84. Ramadan M.; Morsel J. Oil goldenberry (*Physalis peruviana* L). *J. Agric. Food Chem* 2003; 51: 969-974.
85. Ahmad S.; Malik A.; Yasmin R. Ullah N.; Gul W.; Khan PM.; et al. Withanolides from *Physalis peruviana*. *Phytochemistry* 1999; 50: 647-651.
86. Pantelidis G.; Vasilakakis M.; Manganaris G.; Diamantidis G. Antioxidant capacity, phenol, anthocyanin and ascorbic acid contents in raspberries, blackberries, red currants, gooseberries and Cornelian cherries. *Food Chemistry* 2007; 102(3): 777–783.
87. Puente L.; Pinto C.; Castro E.; Cortes M. *Physalis peruviana* L., the multiple properties of a highly functional fruit: A review. Santiago, Chile. *Food Research International* 2011; 44: 1733–1740.
88. Muñoz A.; Ramos-Escudero D.; Alvarado-Ortiz C.; Castañeda, B. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. Lima, Perú. *Revista de la Sociedad Química del Perú* 2007; 73(3): 142-149.
89. Vasco C.; Ruales J.; Kamal - Eldin A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry* 2008; 111(4): 816–823.

90. Wu S.; Ng L.; Chen C.; Lin D.; Wang S. Antihepatoma activity of *Physalis angulata* and *Physalis peruviana* extracts and their effects on apoptosis in human Hep G2 cells. *Life Sci* 2004; 74:2061–2073.
91. Wu S.; Ng L.; Lin D.; Huang S.; Wang S. *Physalis peruviana* extract induces apoptosis in human Hep G2 cells through CD95/CD95L system and the mitochondrial signaling transduction pathway. *Cancer Lett* 2004; 215(2):199-208.
92. Zavala D.; Quispe A.; Posso M.; Rojas J.; Vaisberg A. Efecto citotóxico de *Physalis peruviana* (capulí) en cáncer de colon y leucemia mieloide crónica. *Anales de la Facultad de Medicina* 2006; 67(4): 283-289.
93. Bernal J.; Díaz C. Tecnología para el cultivo de la curuba. Medellín, Colombia: Ed. Lito Madrid; 2005. p. 133-54.
94. Uehara M. Estudio químico del fruto de las passifloraceae: *passiflora liquiaris juss* (granadilla) y *passiflora mollissima* (tumbo serrano) Lima; 1985.
95. Rojano B.; Zapata K.; Cortes F. Capacidad atrapadora de radicales libres de *Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey (curuba). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* 2012; 17(4): 408-419.
96. Fruijtjer-Pölloth C. Safety assessment on polyethylene glycols (PEGs) and their derivatives as used in cosmetic products, *Toxicology* 2005; 214: 1-38.
97. Aguirre L. et al., Validación de métodos analíticos, ed. La asociación española de farmacéuticos de la industria (AEFI). España; 2001.
98. Mejía L. Validación de la técnica para la cuantificación de Tilosina en un producto sólido. [Tesis para optar el título de Microbiólogo Industrial]. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá; 2008.
99. Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Center for Veterinary Medicine (CVM) 2001 May; 1–25. BP.
100. Buenas Prácticas de Manufactura Vigentes. Serie de Informes Técnicos de la OMS (823). Organización Mundial de la Salud. Informe 32. Ginebra. Marzo, 1996.
101. Taylor, J. Validation of Analytical Methods. *Analytical Chemistry* 1983; 55(6): 600A- 608A.

102. Calpena AC, Escribano E, Fernández C. Validación de los métodos analíticos. *Farm Clin* 1991; 7(9): 749-58.
103. Skoog D. Principios de análisis instrumental, sexta edición. Cengage Learning. México. 2008.
104. Gettings S.; Teal J.; Bagley D.; Demetrulias J.; Di Pasquale L.; Hintze K.; et al. The CTFA evaluation of alternatives program: an evaluation of *in vitro* alternatives to the Draize primary eye irritation test (Phase I) hydro-alcoholic formulations; (part 2) data analysis and biological significance. *Toxicology in vitro* 1991; 4(4): 247-288.
105. Gettings S.; Dipasquale L.; Bagley D.; Casterton P.; Chudkowski M.; Curren R. The CTFA evaluation of alternatives program: an evaluation of *in vitro* alternatives to the Draize primary eye irritation test. (Phase II), oil/water emulsions. *Food and chemical toxicology* 1994; 32(10): 943-976.
106. Spielmann H.; Gerner I.; Kalweit S.; Moog R.; Wirnsberger T.; Krauser K.; et al. Interlaboratory assessment of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany. *Toxicology in vitro* 1991; 5(5/6): 539-542.
107. Spielmann H.; Kalweit S.; Liebsch M.; Wirnsberger T.; Gerner I.; Bertram-Neiss E.; et al. Validation study of alternatives to the Draize eye irritation test in Germany: Cytotoxicity testing and HET-CAM test with 136 industrial chemicals. *Toxicology in vitro* 1993; 7(4): 505-510.
108. Spielmann H.; Liebsch M.; Moldenhauer F.; Holzhuetter H.; De Silva O. Modern biostatistical methods for assessing *in vitro/in vivo* correlation of severely eye irritating chemicals in a validation study of *in vitro* alternatives to the Draize eye test. *Toxicology in vitro* 1995 9(4); 549-556.
109. Blein O.; Adolphe M.; Lakhdar B.; Cambar J.; Gubanski G.; Castelli D.; et al. Correlation and validation of alternative methods to the Draize eye irritation test (OPAL project). *Toxicology in vitro* 1991; 5(5/6); 555-557.
110. Balls M.; Botham P.; Bruner L.; Spielmann H. The EC/HO international validation study on alternatives to the Draize eye irritation test.; *Toxicology in vitro* 1995^a; 9(6): 871-929.
111. Gettings S.; Bagley D.; Chudlowski M.; Demetrulias J.; Dipasquale L.; Galli C. Development of potential alternatives to the Draize eye test. The CTFA evaluation of alternatives program (Phase II). Review of materials and methods. *ATLA* 1992; 20: 164-171.

112. Sina J.; Galer D.; Sussman R.; Gautheron P.; Sargent E.; Leong B.; et al. A Collaborative Evaluation of Seven Alternatives to the Draize Eye Irritation Test Using Pharmaceutical Intermediates. *Fundamental and Applied Toxicology* 1995; 26:20-31.
113. Draize J. Dermal toxicity, in Editorial Committee (ed): *Appraisal of the Safety of Chemicals in Food, Drugs and Cosmetics*. Baltimore, Association of Food and Drug Officials of the United States, 1959: 46–59
114. Muir C.; Flower C.; Van N. A novel approach to the search for *in vitro* alternatives to *in vivo* eye irritancy testing. *Toxicology Letters* 1983; 18: 1-5.
115. Sterzel W.; Bartnik F.; Matthies W.; KaÈ W.; KuÈ K. Comparison of two *in vitro* and two *in vivo* methods for the measurement of irritancy. *Toxicology in vitro* 1990; 4: 698-701.
116. Laignier E.; Chiva F.; Másquio F.; Daflon M.; Nunes H. Corroxitex, BCOP and HET-CAM as alternative methods to animal experimentation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 2009; 45 (4): 759-766.
117. García L.; Gleiby M.; Montes de Oca N.; Hidalgo L. Estudio de irritación ocular y dérmica de *Pochonia chlamydosporia* var. *Catenulata*. *Revista de Toxicología* 2004; 21: 103-107.
118. Reyes C. Procedimiento para la validación de métodos analíticos. Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. México; 2007.

ANEXOS

ANEXO 1. Certificado botánico de *Physalis peruviana* L.

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA
CRUZ
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. N° 3796
Cel. 980170139; RPM #963689079



CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO- N° 3796 – INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

CERTIFICA:

Que, la Bachiller **EVELYNG DEL ROSARIO TAYPE ESPINOZA**, egresada de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con fines de investigación para desarrollar la Tesis “Estandarización y validación del método HET-CAM para medir la irritabilidad ocular *in vitro* de los extractos de cinco frutos nativos del Perú utilizados en la industria cosmética”, ha solicitado la certificación botánica de la planta conocida con el nombre vulgar de “aguaymanto”, la muestra ha sido determinada científicamente como *Physalis peruviana* L. Y en el Sistema de Clasificación Botánica de Arthur Cronquist, ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO	: Plantae
DIVISIÓN	: Magnoliophyta
CLASE	: Magnoliopsida
SUBCLASE	: Asteridae
ORDEN	: Solanales
FAMILIA	: Solanaceae
GENERO	: <i>Physalis</i>
ESPECIE	: <i>Physalis peruviana</i> L.

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 15 de noviembre del 2013



Jirón Sánchez Silva # 156 – Urb. Santa Luzmila - Lima 07. Email: jocamde@gmail.com

ANEXO 2. Certificado botánico de *Myrciaria dubia* L.

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA
CRUZ
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. N° 3796
Cel. 980170139; RPM #963689079



CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO- N° 3796 – INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

CERTIFICA:

Que, la Bachiller **EVELYNG DEL ROSARIO TAYPE ESPINOZA**, egresada de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con fines de investigación para desarrollar la Tesis “Estandarización y validación del método HET-CAM para medir la irritabilidad ocular *in vitro* de los extractos de cinco frutos nativos del Perú utilizados en la industria cosmética”, ha solicitado la certificación botánica de la planta conocida con el nombre vulgar de “camu camu”, la muestra ha sido determinada científicamente como *Myrciaria dubia* (Kunth) McVaugh. Y en el Sistema de Clasificación Botánica de Arthur Cronquist, ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO	: Plantae
DIVISIÓN	: Magnoliophyta
CLASE	: Magnoliopsida
SUBCLASE	: Rosidae
ORDEN	: Myrtales
FAMILIA	: Myrtaceae
GENERO	: <i>Myrciaria</i>
ESPECIE	: <i>Myrciaria dubia</i> (Kunth) McVaugh.

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 15 de noviembre del 2013


José R. Campos De La Cruz
BIOLOGO
C.B.P. 3796

Jirón Sánchez Silva # 156 – Urb. Santa Luzmila - Lima 07. Email: jocamde@gmail.com

ANEXO 3. Certificado botánico de *Mauritia flexuosa* L.

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA
CRUZ
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. Nº 3796
Cel. 980170139; RPM #963689079



CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO- Nº 3796 – INSCRITO CON EL Nº 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL Nº 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

CERTIFICA:

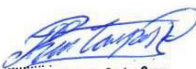
Que, la Bachiller **EVELYNG DEL ROSARIO TAYPE ESPINOZA**, egresada de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con fines de investigación, para desarrollar la Tesis “Estandarización y validación del método HET-CAM para medir la irritabilidad ocular *in vitro* de los extractos de cinco frutos nativos del Perú utilizados en la industria cosmética”, ha solicitado la certificación botánica de la planta conocida con el nombre vulgar de “aguaje”, la muestra ha sido determinada científicamente como *Mauritia flexuosa* L. f. Y según el Sistema de Clasificación Botánica de Arthur Cronquist, ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO	: Plantae
DIVISIÓN	: Magnoliophyta
CLASE	: Liliopsida
SUBCLASE	: Arecidae
ORDEN	: Arecales
FAMILIA	: Arecaceae
GENERO	: <i>Mauritia</i>
ESPECIE	: <i>Mauritia flexuosa</i> L. f.

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 15 de noviembre del 2013




José R. Campos De La Cruz
BIÓLOGO
C.B.P. 3796

Jirón Sánchez Silva # 156 – Urb. Santa Luzmila - Lima 07. Email: jocamde@gmail.com

ANEXO 4. Certificado botánico de *Solanum sessiliflorum* D.

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA
CRUZ
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. N° 3796
Cel. 980170139; RPM #963689079



CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO- N° 3796 – INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

CERTIFICA:

Que, la Bachiller **EVELYNG DEL ROSARIO TAYPE ESPINOZA**, egresada de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con fines de investigación para desarrollar la Tesis “Estandarización y validación del método HET-CAM para medir la irritabilidad ocular *in vitro* de los extractos de cinco frutos nativos del Perú utilizados en la industria cosmética”, ha solicitado la certificación botánica de la planta conocida con el nombre vulgar de “cocona”, la muestra ha sido determinada científicamente como *Solanum sessiliflorum* Dunal. Y en el Sistema de Clasificación Botánica de Arthur Cronquist, ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO	: Plantae
DIVISIÓN	: Magnoliophyta
CLASE	: Magnoliopsida
SUBCLASE	: Asteridae
ORDEN	: Solanales
FAMILIA	: Solanaceae
GENERO	: <i>Solanum</i>
ESPECIE	: <i>Solanum sessiliflorum</i> Dunal

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 15 de noviembre del 2013



Jose R. Campos De La Cruz
José R. Campos De La Cruz
BIOLOGO
C.B.P. 3796

Jirón Sánchez Silva # 156 – Urb. Santa Luzmila - Lima 07. Email: jocamde@gmail.com

ANEXO 5. Certificado botánico de *Passiflora mollissima* HBK

JOSÉ RICARDO CAMPOS DE LA
CRUZ
CONSULTOR BOTÁNICO
C. B. P. N° 3796
Cel. 980170139; RPM #963689079



CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACION BOTÁNICA

JOSÉ R. CAMPOS DE LA CRUZ. BIÓLOGO COLEGIADO- N° 3796 – INSCRITO CON EL N° 36 EN EL REGISTRO DE PROFESIONALES QUE REALIZAN CERTIFICACIÓN DE IDENTIFICACIÓN TAXONÓMICA DE ESPECÍMENES Y PRODUCTOS DE FLORA - RESOLUCIÓN DIRECTORAL N° 0311-2013- MINAGRI-DGFFS-DGEFFS.

CERTIFICA:

Que, la Bachiller **EVELYNG DEL ROSARIO TAYPE ESPINOZA**, egresada de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, con fines de investigación para desarrollar la Tesis “Estandarización y validación del método HET-CAM para medir la irritabilidad ocular *in vitro* de los extractos de cinco frutos nativos del Perú utilizados en la industria cosmética”, ha solicitado la certificación botánica de la planta conocida con el nombre vulgar de “**tumbo serrano**”, la muestra ha sido determinada científicamente como *Passiflora mollissima* (Kunth) L.H. Bailey. Y según el Sistema de Clasificación Botánica de Arthur Cronquist, ocupa las siguientes categorías taxonómicas.

REINO	: Plantae
DIVISIÓN	: Magnoliophyta
CLASE	: Magnoliopsida
SUBCLASE	: Dilleniidae
ORDEN	: Violales
FAMILIA	: Passifloraceae
GENERO	: <i>Passiflora</i>
ESPECIE	: <i>Passiflora mollissima</i> (Kunth) L.H. Bailey

Se expide la presente certificación para los fines que se estime conveniente.

Lima, 15 de noviembre del 2013


 José R. Campos De La Cruz
BIOLOGO
C.B.P. 3796

Jirón Sánchez Silva # 156 – Urb. Santa Luzmila - Lima 07. Email: jocamde@gmail.com

Anexo 6. Resultados del método CAM-TBS

Tabla 15. Datos del método CAM-TBS para los extractos de aguaymanto

MUESTRA (AGUAYMANTO)	HUEVO Nº	PESO (mg)	ABS	COLORANTE CONC (moles)	CONC/mg	CANTIDAD DE COLORANTE ABSORBIDO (nmoles/mg)	PROMEDIO CANTIDAD COLORANTE
EXTRACTO ACUOSO	1	114,6	0,101	$3,154 \times 10^{-6}$	$2,752 \times 10^{-8}$	0,1376	$0,1371 \pm$ $0,0113$
	2	103,2	0,098	$3,056 \times 10^{-6}$	$2,961 \times 10^{-8}$	0,1480	
	3	167,5	0,133	$4,206 \times 10^{-6}$	$2,511 \times 10^{-8}$	0,1255	
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO	1	69,7	0,115	$3,614 \times 10^{-6}$	$5,185 \times 10^{-8}$	0,2593	$0,2616 \pm$ $0,0046$
	2	83,2	0,136	$4,304 \times 10^{-6}$	$5,173 \times 10^{-8}$	0,2587	
	3	91,1	0,153	$4,863 \times 10^{-6}$	$5,338 \times 10^{-8}$	0,2669	
EXTRACTO GLICÓLICO	1	90,3	0,115	$3,614 \times 10^{-6}$	$4,003 \times 10^{-8}$	0,2001	$0,1991 \pm$ $0,0476$
	2	185,6	0,216	$6,933 \times 10^{-6}$	$3,735 \times 10^{-8}$	0,1868	
	3	212,5	0,271	$8,740 \times 10^{-6}$	$4,113 \times 10^{-8}$	0,2056	

Tabla 16. Datos del método CAM-TBS para los extractos de camu camu

MUESTRA (CAMU CAMU)	HUEVO Nº	PESO (mg)	ABS	COLORANTE CONC (moles)	CONC/mg	CANTIDAD DE COLORANTE ABSORBIDO (nmoles/mg)	PROMEDIO CANTIDAD COLORANTE
EXTRACTO ACUOSO	1	134,1	0,212	$6,801 \times 10^{-6}$	$5,072 \times 10^{-8}$	0,2536	$0,1991 \pm$ $0,0476$
	2	98,4	0,104	$3,253 \times 10^{-6}$	$3,306 \times 10^{-8}$	0,1653	
	3	117,8	0,133	$4,206 \times 10^{-6}$	$3,570 \times 10^{-8}$	0,1785	
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO	1	46,5	0,056	$1,676 \times 10^{-6}$	$3,604 \times 10^{-8}$	0,1802	$0,1661 \pm$ $0,0130$
	2	81,9	0,082	$2,530 \times 10^{-6}$	$3,089 \times 10^{-8}$	0,1545	
	3	66,2	0,071	$2,169 \times 10^{-6}$	$3,276 \times 10^{-8}$	0,1638	
EXTRACTO GLICÓLICO	1	72,2	0,211	$6,769 \times 10^{-6}$	$9,375 \times 10^{-8}$	0,4687	$0,3918 \pm$ $0,0147$
	2	53,7	0,117	$3,680 \times 10^{-6}$	$6,853 \times 10^{-8}$	0,3426	
	3	121,4	0,274	$8,839 \times 10^{-6}$	$7,280 \times 10^{-8}$	0,3640	

Tabla 17. Datos del método CAM-TBS para los extractos de aguaje

MUESTRA (AGUAJE)	HUEVO Nº	PESO (mg)	ABS	COLORANTE CONC (moles)	CONC/mg	CANTIDAD DE COLORANTE ABSORBIDO (nmoles/mg)	PROMEDIO CANTIDAD COLORANTE
EXTRACTO ACUOSO	1	30,2	0,063	$1,906 \times 10^{-6}$	$6,310 \times 10^{-8}$	0,3155	0,3271 ± 0,0147
	2	91,8	0,197	$6,309 \times 10^{-6}$	$6,872 \times 10^{-8}$	0,3436	
	3	66,3	0,135	$4,271 \times 10^{-6}$	$6,443 \times 10^{-8}$	0,3221	
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO	1	92,2	0,168	$5,356 \times 10^{-6}$	$5,809 \times 10^{-8}$	0,2904	0,3080 ± 0,0394
	2	45,1	0,082	$2,530 \times 10^{-6}$	$5,610 \times 10^{-8}$	0,2805	
	3	30,7	0,071	$2,169 \times 10^{-6}$	$7,064 \times 10^{-8}$	0,3532	
EXTRACTO GLICÓLICO	1	66,3	0,226	$7,261 \times 10^{-6}$	$1,095 \times 10^{-7}$	0,5476	0,0721 ± 0,0462
	2	55,2	0,167	$5,323 \times 10^{-6}$	$9,643 \times 10^{-8}$	0,4821	
	3	89,7	0,291	$9,397 \times 10^{-6}$	$1,048 \times 10^{-7}$	0,5238	

Tabla 18. Datos del método CAM-TBS para los extractos de cocona

MUESTRA (COCONA)	HUEVO Nº	PESO (mg)	ABS	COLORANTE CONC (moles)	CONC/mg	CANTIDAD DE COLORANTE ABSORBIDO (nmoles/mg)	PROMEDIO CANTIDAD COLORANTE
EXTRACTO ACUOSO	1	105,9	0,033	$9,200 \times 10^{-7}$	$8,687 \times 10^{-9}$	0,0434	0,0721 ± 0,0462
	2	128,1	0,042	$1,216 \times 10^{-6}$	$9,490 \times 10^{-9}$	0,0475	
	3	107,4	0,087	$2,694 \times 10^{-6}$	$2,509 \times 10^{-8}$	0,1254	
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO	1	49,8	0,079	$2,431 \times 10^{-6}$	$4,882 \times 10^{-8}$	0,2441	0,1971 ± 0,0411
	2	83,9	0,091	$2,826 \times 10^{-6}$	$3,368 \times 10^{-8}$	0,1684	
	3	72,6	0,084	$2,596 \times 10^{-6}$	$3,575 \times 10^{-8}$	0,1788	
EXTRACTO GLICÓLICO	1	92,7	0,125	$3,943 \times 10^{-6}$	$4,253 \times 10^{-8}$	0,2127	0,2108 ± 0,0176
	2	109,3	0,133	$4,206 \times 10^{-6}$	$3,848 \times 10^{-8}$	0,1924	
	3	125,7	0,179	$5,717 \times 10^{-6}$	$4,548 \times 10^{-8}$	0,2274	

Tabla 19. Datos del método CAM-TBS para los extractos de tumbo serrano

MUESTRA (TUMBO SERRANO)	HUEVO Nº	PESO (mg)	ABS	COLORANTE CONC (moles)	CONC/mg	CANTIDAD DE COLORANTE ABSORBIDO (nmoles/mg)	PROMEDIO CANTIDAD COLORANTE
EXTRACTO ACUOSO	1	99,7	0,071	$2,169 \times 10^{-6}$	$2,175 \times 10^{-8}$	0,1088	$0,0960 \pm 0,0112$
	2	91,6	0,054	$1,610 \times 10^{-6}$	$1,758 \times 10^{-8}$	0,0879	
	3	102,4	0,062	$1,873 \times 10^{-6}$	$1,829 \times 10^{-8}$	0,0914	
EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO	1	81,3	0,068	$2,070 \times 10^{-6}$	$2,546 \times 10^{-8}$	0,1273	$0,1122 \pm 0,0233$
	2	90,1	0,073	$2,234 \times 10^{-6}$	$2,480 \times 10^{-8}$	0,1240	
	3	88,5	0,051	$1,511 \times 10^{-6}$	$1,708 \times 10^{-8}$	0,0854	
EXTRACTO GLICÓLICO	1	112,7	0,115	$3,614 \times 10^{-6}$	$3,207 \times 10^{-8}$	0,1603	$0,1784 \pm 0,0313$
	2	87,3	0,119	$3,746 \times 10^{-6}$	$4,291 \times 10^{-8}$	0,2145	
	3	130,1	0,132	$4,173 \times 10^{-6}$	$3,207 \times 10^{-8}$	0,1604	

Anexo 7. Resultados de la Repetibilidad del método CAM-TBS

Tabla 20. Repetibilidad para el extracto acuoso de aguaymanto

MUESTRA	HUEVO N°	PESO (mg)	ABS	COLORANTE CONC (moles)	CONC/mg	CANTIDAD DE COLORANTE ABSORBIDO (nmoles/mg)	PROMEDIO CANTIDAD COLORANTE ABSORBIDO (CA)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
EXTRACTO ACUOSO AGUAYMANTO	1	51,4	0,043	$1,249 \times 10^{-6}$	$2,429 \times 10^{-8}$	0,1215	0,1237 ± 0,0119	0.0119
	2	59,8	0,048	$1,413 \times 10^{-6}$	$2,363 \times 10^{-8}$	0,1181		
	3	56,7	0,049	$1,446 \times 10^{-6}$	$2,550 \times 10^{-8}$	0,1275		
	4	50,3	0,052	$1,544 \times 10^{-6}$	$3,070 \times 10^{-8}$	0,1535		
	5	60,8	0,051	$1,511 \times 10^{-6}$	$2,486 \times 10^{-8}$	0,1243		
	6	60,2	0,048	$1,413 \times 10^{-6}$	$2,347 \times 10^{-8}$	0,1173		COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV)
	7	53,6	0,046	$1,347 \times 10^{-6}$	$2,513 \times 10^{-8}$	0,1257		
	8	57,8	0,042	$1,216 \times 10^{-6}$	$2,103 \times 10^{-8}$	0,1052		
	9	54,1	0,047	$1,380 \times 10^{-6}$	$2,551 \times 10^{-8}$	0,1275		
	10	63,2	0,051	$1,511 \times 10^{-6}$	$2,391 \times 10^{-8}$	0,1196		
	11	50,8	0,043	$1,249 \times 10^{-6}$	$2,458 \times 10^{-8}$	0,1229		9.6008
	12	51,1	0,047	$1,380 \times 10^{-6}$	$2,701 \times 10^{-8}$	0,1350		
	13	57,7	0,041	$1,183 \times 10^{-6}$	$2,050 \times 10^{-8}$	0,1025		
	14	61,3	0,052	$1,544 \times 10^{-6}$	$2,519 \times 10^{-8}$	0,1260		
	15	60,9	0,053	$1,577 \times 10^{-6}$	$2,590 \times 10^{-8}$	0,1295		

Tabla 21. Repetibilidad para el extracto acuoso de camu camu

MUESTRA	HUEVO N°	PESO (mg)	ABS	COLORANTE CONC (moles)	CONC/mg	CANTIDAD DE COLORANTE ABSORBIDO (nmoles/mg)	PROMEDIO CANTIDAD COLORANTE ABSORBIDO (CA)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
EXTRACTO ACUOSO CAMU CAMU	1	60,2	0,073	$2,234 \times 10^{-6}$	$3,711 \times 10^{-8}$	0,1856	0,1868 ± 0,0137	0.0137
	2	61,1	0,068	$2,070 \times 10^{-6}$	$3,388 \times 10^{-8}$	0,1694		
	3	50,7	0,069	$2,103 \times 10^{-6}$	$4,148 \times 10^{-8}$	0,2074		
	4	54,8	0,072	$2,201 \times 10^{-6}$	$4,017 \times 10^{-8}$	0,2009		
	5	55,9	0,071	$2,169 \times 10^{-6}$	$3,879 \times 10^{-8}$	0,1940		
	6	63,2	0,068	$2,070 \times 10^{-6}$	$3,275 \times 10^{-8}$	0,1638		COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV)
	7	60,9	0,076	$2,333 \times 10^{-6}$	$3,831 \times 10^{-8}$	0,1915		
	8	63,4	0,074	$2,267 \times 10^{-6}$	$3,576 \times 10^{-8}$	0,1788		
	9	57,6	0,077	$2,366 \times 10^{-6}$	$4,107 \times 10^{-8}$	0,2054		
	10	62,1	0,071	$2,169 \times 10^{-6}$	$3,492 \times 10^{-8}$	0,1746		
	11	52,3	0,063	$1,906 \times 10^{-6}$	$3,644 \times 10^{-8}$	0,1822		7.3541
	12	51,1	0,067	$2,037 \times 10^{-6}$	$3,987 \times 10^{-8}$	0,1993		
	13	54,5	0,061	$1,840 \times 10^{-6}$	$3,376 \times 10^{-8}$	0,1688		
	14	56,7	0,072	$2,201 \times 10^{-6}$	$3,883 \times 10^{-8}$	0,1941		
	15	59,8	0,073	$2,234 \times 10^{-6}$	$3,736 \times 10^{-8}$	0,1868		

Tabla 22. Repetibilidad para el extracto acuoso de aguaje

MUESTRA	HUEVO N°	PESO (mg)	ABS	COLORANTE CONC (moles)	CONC/mg	CANTIDAD DE COLORANTE ABSORBIDO (nmoles/mg)	PROMEDIO CANTIDAD COLORANTE ABSORBIDO (CA)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
EXTRACTO ACUOSO AGUAJE	1	55,4	0,123	$3,877 \times 10^{-6}$	$6,998 \times 10^{-8}$	0,3499	0,3632 ± 0,0189	0.0189
	2	52,3	0,118	$3,713 \times 10^{-6}$	$7,099 \times 10^{-8}$	0,3550		
	3	57,5	0,142	$4,501 \times 10^{-6}$	$7,829 \times 10^{-8}$	0,3914		
	4	60,1	0,134	$4,239 \times 10^{-6}$	$7,052 \times 10^{-8}$	0,3526		
	5	63,2	0,141	$4,469 \times 10^{-6}$	$7,070 \times 10^{-8}$	0,3535		
	6	57,8	0,147	$4,666 \times 10^{-6}$	$8,072 \times 10^{-8}$	0,4036		COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV)
	7	59,4	0,132	$4,173 \times 10^{-6}$	$7,025 \times 10^{-8}$	0,3512		
	8	62,8	0,132	$4,173 \times 10^{-6}$	$6,645 \times 10^{-8}$	0,3322		
	9	57,7	0,136	$4,304 \times 10^{-6}$	$7,460 \times 10^{-8}$	0,3730		
	10	58,9	0,137	$4,337 \times 10^{-6}$	$7,364 \times 10^{-8}$	0,3682		
	11	59,6	0,132	$4,173 \times 10^{-6}$	$7,001 \times 10^{-8}$	0,3501		5.2106
	12	60,1	0,146	$4,633 \times 10^{-6}$	$7,709 \times 10^{-8}$	0,3854		
	13	63,2	0,139	$4,403 \times 10^{-6}$	$6,966 \times 10^{-8}$	0,3483		
	14	58,4	0,135	$4,271 \times 10^{-6}$	$7,314 \times 10^{-8}$	0,3657		
	15	61,7	0,143	$4,534 \times 10^{-6}$	$7,349 \times 10^{-8}$	0,3674		

Tabla 23. Repetibilidad para el extracto acuoso de cocona

MUESTRA	HUEVO Nº	PESO (mg)	ABS	COLORANTE CONC (moles)	CONC/mg	CANTIDAD DE COLORANTE ABSORBIDO (nmoles/mg)	PROMEDIO CANTIDAD COLORANTE ABSORBIDO (CA)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
EXTRACTO ACUOSO COCONA	1	60,4	0,032	$8,871 \times 10^{-7}$	$1,469 \times 10^{-8}$	0,0734	0,0768 ± 0,0076	0.0076
	2	62,3	0,037	$1,051 \times 10^{-6}$	$1,688 \times 10^{-8}$	0,0844		
	3	56,8	0,031	$8,543 \times 10^{-7}$	$1,504 \times 10^{-8}$	0,0752		
	4	60,2	0,035	$9,857 \times 10^{-7}$	$1,637 \times 10^{-8}$	0,0819		
	5	57,8	0,027	$7,229 \times 10^{-7}$	$1,251 \times 10^{-8}$	0,0625		
	6	54,3	0,033	$9,200 \times 10^{-7}$	$1,694 \times 10^{-8}$	0,0847		COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV)
	7	61,7	0,037	$1,051 \times 10^{-6}$	$1,704 \times 10^{-8}$	0,0852		
	8	63,2	0,031	$8,543 \times 10^{-7}$	$1,352 \times 10^{-8}$	0,0676		
	9	58,9	0,033	$9,200 \times 10^{-7}$	$1,562 \times 10^{-8}$	0,0781		
	10	57,7	0,028	$7,557 \times 10^{-7}$	$1,310 \times 10^{-8}$	0,0655		
	11	60,1	0,034	$9,529 \times 10^{-7}$	$1,585 \times 10^{-8}$	0,0793		9.8663
	12	54,2	0,029	$7,886 \times 10^{-7}$	$1,455 \times 10^{-8}$	0,0727		
	13	57,3	0,031	$8,543 \times 10^{-7}$	$1,491 \times 10^{-8}$	0,0745		
	14	59,8	0,037	$1,051 \times 10^{-6}$	$1,758 \times 10^{-8}$	0,0879		
	15	60,5	0,034	$9,529 \times 10^{-7}$	$1,575 \times 10^{-8}$	0,0787		

Tabla 24. Repetibilidad para el extracto acuoso de tumbo serrano

MUESTRA	HUEVO Nº	PESO (mg)	ABS	COLORANTE CONC (moles)	CONC/mg	CANTIDAD DE COLORANTE ABSORBIDO (nmoles/mg)	PROMEDIO CANTIDAD COLORANTE ABSORBIDO (CA)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR
EXTRACTO ACUOSO TUMBO SERRANO	1	60,2	0,044	$1,281 \times 10^{-6}$	$2,129 \times 10^{-8}$	0,1064	0,0967 ± 0,0079	0.0079
	2	59,3	0,038	$1,084 \times 10^{-6}$	$1,828 \times 10^{-8}$	0,0914		
	3	60,5	0,043	$1,249 \times 10^{-6}$	$2,064 \times 10^{-8}$	0,1032		
	4	58,1	0,037	$1,051 \times 10^{-6}$	$1,810 \times 10^{-8}$	0,0905		
	5	59,4	0,036	$1,019 \times 10^{-6}$	$1,715 \times 10^{-8}$	0,0857		
	6	64,3	0,041	$1,183 \times 10^{-6}$	$1,840 \times 10^{-8}$	0,0920		COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV)
	7	60,2	0,042	$1,216 \times 10^{-6}$	$2,019 \times 10^{-8}$	0,1010		
	8	59,8	0,041	$1,183 \times 10^{-6}$	$1,978 \times 10^{-8}$	0,0989		
	9	61,1	0,039	$1,117 \times 10^{-6}$	$1,828 \times 10^{-8}$	0,0914		
	10	59,3	0,042	$1,216 \times 10^{-6}$	$2,050 \times 10^{-8}$	0,1025		
	11	62,8	0,047	$1,380 \times 10^{-6}$	$2,197 \times 10^{-8}$	0,1099		8.1544
	12	55,3	0,036	$1,019 \times 10^{-6}$	$1,842 \times 10^{-8}$	0,0921		
	13	57,4	0,034	$9,529 \times 10^{-7}$	$1,660 \times 10^{-8}$	0,0830		
	14	56,9	0,041	$1,183 \times 10^{-6}$	$2,079 \times 10^{-8}$	0,1039		
	15	61,3	0,042	$1,216 \times 10^{-6}$	$1,983 \times 10^{-8}$	0,0992		

Anexo 8. Resultados de la Reproducibilidad del método CAM-TBS

Tabla 25. Reproducibilidad de los extractos acuosos (CA (nmoles/mg))

EXTRACTO	DÍAS DE ANÁLISIS	ANALISTA 1			ANALISTA 2			PROMEDIO (CA)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV)
		R1	R2	R3	R1	R2	R3			
AGUAYMANTO ACUOSO	DIA 1	0,1286	0,1251	0,1268	0,1237	0,1273	0,1245	0,1260	0,0019	1,4822
	DIA 2	0,1144	0,1159	0,1132	0,1145	0,1162	0,1167	0,1152	0,0013	1,1557
CAMU CAMU ACUOSO	DIA 1	0,1841	0,1867	0,1835	0,1857	0,1874	0,1892	0,1861	0,0021	1,1419
	DIA 2	0,1924	0,1961	0,1973	0,1988	0,1992	0,1972	0,1968	0,0025	1,2447
AGUAJE ACUOSO	DIA 1	0,3564	0,3581	0,3673	0,3853	0,3877	0,3921	0,3745	0,0158	4,2206
	DIA 2	0,3721	0,3744	0,3865	0,3806	0,3812	0,3852	0,3800	0,0057	1,5111
COCONA ACUOSO	DIA 1	0,0641	0,0635	0,0712	0,0620	0,0693	0,0711	0,0669	0,0041	6,1768
	DIA 2	0,0634	0,0678	0,0746	0,0715	0,0689	0,0692	0,0692	0,0037	5,4096
TUMBO SERRANO ACUOSO	DIA 1	0,0951	0,1024	0,0965	0,1063	0,0933	0,0978	0,0986	0,0049	4,9518
	DIA 2	0,1012	0,0955	0,0989	0,0927	0,0932	0,0902	0,0953	0,0041	4,3269

R: Cantidad de colorante absorbido (nmoles/mg)

Anexo 9. Resultados de la Robustez del método CAM-TBS

Tabla 26. Robustez de los extractos acuosos (CA (nmoles/mg))

EXTRACTO	DÍAS DE ANÁLISIS	UNIVERSIDAD SAN MARTIN DE PORRES (ANALISTA1)			EMPRESA INGENIOIDEA (ANALISTA 2)			PROMEDIO (CA)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (CV)
		R1	R2	R3	R1	R2	R3			
AGUAYMANTO ACUOSO	DIA 1	0,1254	0,1273	0,1289	0,1327	0,1344	0,1321	0,1301	0,0035	2,6755
	DIA 2	0,1236	0,1267	0,1284	0,1358	0,1347	0,1349	0,1307	0,0051	3,9220
	DIA 3	0,1291	0,1296	0,1277	0,1352	0,1353	0,1368	0,1323	0,0039	2,95
CAMU CAMU ACUOSO	DIA 1	0,1948	0,1934	0,1965	0,1933	0,1982	0,1971	0,1956	0,0020	1,0374
	DIA 2	0,1977	0,1965	0,1981	0,1982	0,1957	0,1968	0,1972	0,0010	0,5048
	DIA 3	0,1933	0,1940	0,1936	0,1963	0,1982	0,1969	0,1954	0,0020	1,04
AGUAJE ACUOSO	DIA 1	0,3772	0,3770	0,3854	0,3921	0,3963	0,3978	0,3876	0,0092	2,3794
	DIA 2	0,3841	0,3721	0,3816	0,3958	0,3912	0,3975	0,3871	0,0096	2,4913
	DIA 3	0,3827	0,3833	0,3842	0,3966	0,3981	0,3966	0,3903	0,0075	1,93
COCONA ACUOSO	DIA 1	0,0643	0,0612	0,0687	0,0742	0,0731	0,0758	0,0696	0,0059	8,4157
	DIA 2	0,0632	0,0643	0,0619	0,0738	0,0722	0,0754	0,0685	0,0060	8,7310
	DIA 3	0,0658	0,0631	0,0685	0,0749	0,0756	0,0783	0,0710	0,0061	8,57
TUMBO SERRANO ACUOSO	DIA 1	0,0978	0,0942	0,0957	0,0923	0,0912	0,0921	0,0939	0,0025	2,6790
	DIA 2	0,0986	0,0961	0,0973	0,0916	0,0925	0,0917	0,0946	0,0031	3,2520
	DIA 3	0,0945	0,0954	0,0937	0,0927	0,0918	0,0913	0,0932	0,0016	1,70

R: Cantidad de colorante absorbido (nmoles/mg)

Anexo 10. Resultados de la Exactitud del método CAM-TBS

Tabla 27. Exactitud por el método de adición de patrón (hidróxido de sodio)

MUESTRA (PATRÓN)	HUEVO Nº	PESO (mg)	ABS	COLORANTE CONC (moles)	CONC / mg	CANTIDAD DE COLORANTE ABSORBIDO (nmoles/mg)	PROMEDIO CANTIDAD COLORANTE	PORCENTAJE QUE REPRESENTA CADA EXTRACTO AÑADIDO (%)
HIDRÓXIDO DE SODIO 0,08N	1	53,7	0,084	$2,596 \times 10^{-6}$	$4,834 \times 10^{-8}$	0,2417	0,2391 ± 0,0174	80%
	2	64,8	0,092	$2,859 \times 10^{-6}$	$4,411 \times 10^{-8}$	0,2206		
	3	54,1	0,089	$2,760 \times 10^{-6}$	$5,102 \times 10^{-8}$	0,2551		
HIDRÓXIDO DE SODIO 0,1N	1	55,3	0,104	$3,253 \times 10^{-6}$	$5,882 \times 10^{-8}$	0,2941	0,2841 ± 0,0286	100%
	2	60,6	0,118	$3,713 \times 10^{-6}$	$6,127 \times 10^{-8}$	0,3063		
	3	58,7	0,095	$2,957 \times 10^{-6}$	$5,038 \times 10^{-8}$	0,2519		
HIDRÓXIDO DE SODIO 0,12N	1	52,9	0,133	$4,206 \times 10^{-6}$	$7,950 \times 10^{-8}$	0,3975	0,3698 ± 0,0241	120%
	2	63,1	0,141	$4,469 \times 10^{-6}$	$7,082 \times 10^{-8}$	0,3541		
	3	60,6	0,137	$4,337 \times 10^{-6}$	$7,157 \times 10^{-8}$	0,3578		

Tabla 28. Exactitud del extracto acuoso de aguaymanto por el método de adición de patrón (hidróxido de sodio)

EXTRACTO	HUEVO Nº	PESO (mg)	ABS	COLORANTE CONC (moles)	CONC/mg	CANTIDAD DE COLORANTE ABSORBIDO (nmoles/mg)	PROMEDIO CANTIDAD COLORANTE
AGUAYMANTO ACUOSO	1	64,6	0,054	$1,610 \times 10^{-6}$	$2,492 \times 10^{-8}$	0,1246	0,1277± 0,0044
	2	53,2	0,048	$1,413 \times 10^{-6}$	$2,656 \times 10^{-8}$	0,1328	
	3	57,5	0,049	$1,446 \times 10^{-6}$	$2,514 \times 10^{-8}$	0,1257	
AGUAYMANTO ACUOSO+ NaOH 80%	1	55,3	0,097	$3,023 \times 10^{-6}$	$5,466 \times 10^{-8}$	0,2733	0,2885 ± 0,0205
	2	58,6	0,105	$3,286 \times 10^{-6}$	$5,607 \times 10^{-8}$	0,2803	
	3	62,7	0,124	$3,910 \times 10^{-6}$	$6,236 \times 10^{-8}$	0,3118	
AGUAYMANTO ACUOSO+ NaOH 100%	1	53,8	0,115	$3,614 \times 10^{-6}$	$6,718 \times 10^{-8}$	0,3359	0,3740± 0,0345
	2	56,2	0,136	$4,304 \times 10^{-6}$	$7,659 \times 10^{-8}$	0,3829	
	3	60,3	0,153	$4,863 \times 10^{-6}$	$8,064 \times 10^{-8}$	0,4032	
AGUAYMANTO ACUOSO+ NaOH 120%	1	50,7	0,178	$5,684 \times 10^{-6}$	$1,121 \times 10^{-7}$	0,5606	0,5775± 0,0165
	2	58,4	0,216	$6,933 \times 10^{-6}$	$1,187 \times 10^{-7}$	0,5936	
	3	64,2	0,231	$7,426 \times 10^{-6}$	$1,157 \times 10^{-7}$	0,5783	

Tabla 29. Cálculo del porcentaje de recuperación del extracto de acuoso de aguaymanto por el método de adición de patrón (hidróxido de sodio)

PATRÓN AÑADIDO	PROMEDIO COLORANTE ABSORBIDO	MUESTRA	PROMEDIO COLORANTE ABSORBIDO	CONCENTRACIONES CORREGIDAS DEL EXTRACTO	PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN (%)
---	---	AGUAYMANTO ACUOSO	0,1277	---	---
NaOH 0,08 N	0,2391	AGUAYMANTO ACUOSO + NaOH 80%	0,2885	0,1608	67,25%
NaOH 0,1 N	0,2841	AGUAYMANTO ACUOSO + NaOH 100%	0,3740	0,2463	86,69%
NaOH 0,12 N	0,3698	AGUAYMANTO ACUOSO + NaOH 120%	0,5775	0,4498	121,63%

Tabla 30. Exactitud del extracto de camu camu acuoso por el método de adición de patrón (hidróxido de sodio)

EXTRACTO	HUEVO N°	PESO (mg)	ABS	COLORANTE CONC (moles)	CONC/mg	CANTIDAD DE COLORANTE ABSORBIDO (nmoles/mg)	PROMEDIO CANTIDAD COLORANTE
CAMU CAMU ACUOSO	1	64,2	0,075	$2,300 \times 10^{-6}$	$3,583 \times 10^{-8}$	0,1791	0,1987± 0,0200
	2	58,5	0,083	$2,563 \times 10^{-6}$	$4,381 \times 10^{-8}$	0,2190	
	3	63,1	0,081	$2,497 \times 10^{-6}$	$3,957 \times 10^{-8}$	0,1979	
CAMU CAMU ACUOSO + NaOH 80%	1	64,7	0,084	$2,596 \times 10^{-6}$	$4,012 \times 10^{-8}$	0,2006	0,2179± 0,0214
	2	59,8	0,093	$2,891 \times 10^{-6}$	$4,835 \times 10^{-8}$	0,2416	
	3	55,2	0,076	$2,333 \times 10^{-6}$	$4,226 \times 10^{-8}$	0,2113	
CAMU CAMU ACUOSO+ NaOH 100%	1	59,4	0,106	$3,319 \times 10^{-6}$	$5,587 \times 10^{-8}$	0,2793	0,3096± 0,0298
	2	56,7	0,122	$3,844 \times 10^{-6}$	$6,780 \times 10^{-8}$	0,3390	
	3	60,3	0,119	$3,746 \times 10^{-6}$	$6,212 \times 10^{-8}$	0,3106	
CAMU CAMU ACUOSO + NaOH 120%	1	62,2	0,196	$6,276 \times 10^{-6}$	$1,009 \times 10^{-7}$	0,5045	0,5104± 0,0089
	2	58,1	0,184	$5,881 \times 10^{-6}$	$1,012 \times 10^{-7}$	0,5061	
	3	60,9	0,198	$6,341 \times 10^{-6}$	$1,041 \times 10^{-7}$	0,5206	

Tabla 31. Cálculo del porcentaje de recuperación del extracto acuoso de camu camu por el método de adición de patrón (hidróxido de sodio)

PATRÓN AÑADIDO	PROMEDIO COLORANTE ABSORBIDO	MUESTRA	PROMEDIO COLORANTE ABSORBIDO	CONCENTRACIONES CORREGIDAS DEL EXTRACTO	PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN (%)
----	----	CAMU CAMU ACUOSO	0,1987	-----	-----
NaOH 0,08 N	0,2391	CAMU CAMU ACUOSO + NaOH 80%	0,2179	0,0192	8,03%
NaOH 0,1 N	0,2841	CAMU CAMU ACUOSO + NaOH 100%	0,3096	0,1110	39,07%
NaOH 0,12 N	0,3698	CAMU CAMU ACUOSO + NaOH 120%	0,5104	0,3117	84,28%

Tabla 32. Exactitud del extracto acuoso de aguaje por el método de adición de patrón (hidróxido de sodio)

EXTRACTO	HUEVO Nº	PESO (mg)	ABS	COLORANTE CONC (moles)	CONC/mg	CANTIDAD DE COLORANTE ABSORBIDO (nmoles/mg)	PROMEDIO CANTIDAD COLORANTE
AGUAJE ACUOSO	1	51,6	0,087	$2,694 \times 10^{-6}$	$5,221 \times 10^{-8}$	0,2611	0,2418± 0,0169
	2	55,8	0,083	$2,563 \times 10^{-6}$	$4,593 \times 10^{-8}$	0,2296	
	3	62,3	0,094	$2,924 \times 10^{-6}$	$4,694 \times 10^{-8}$	0,2347	
AGUAJE ACUOSO + NaOH 80%	1	60,7	0,124	$3,910 \times 10^{-6}$	$6,441 \times 10^{-8}$	0,3221	0,3365± 0,0165
	2	61,2	0,129	$4,074 \times 10^{-6}$	$6,657 \times 10^{-8}$	0,3329	
	3	58,4	0,131	$4,140 \times 10^{-6}$	$7,089 \times 10^{-8}$	0,3544	
AGUAJE ACUOSO + NaOH 100%	1	62,5	0,169	$5,389 \times 10^{-6}$	$8,622 \times 10^{-8}$	0,4311	0,4243± 0,0187
	2	55,8	0,154	$4,896 \times 10^{-6}$	$8,774 \times 10^{-8}$	0,4387	
	3	60,3	0,153	$4,863 \times 10^{-6}$	$8,064 \times 10^{-8}$	0,4032	
AGUAJE ACUOSO + NaOH 120%	1	63,5	0,212	$6,801 \times 10^{-6}$	$1,071 \times 10^{-7}$	0,5355	0,5506± 0,0253
	2	57,8	0,209	$6,703 \times 10^{-6}$	$1,160 \times 10^{-7}$	0,5798	
	3	59,1	0,198	$6,341 \times 10^{-6}$	$1,073 \times 10^{-7}$	0,5365	

Tabla 33. Cálculo del porcentaje de recuperación del extracto acuoso de aguaje por el método de adición de patrón (hidróxido de sodio)

PATRÓN AÑADIDO	PROMEDIO COLORANTE ABSORBIDO	EXTRACTO	PROMEDIO COLORANTE ABSORBIDO	CONCENTRACIONES CORREGIDAS DEL EXTRACTO	PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN (%)
-----	-----	AGUAJE ACUOSO	0,2418	-----	-----
NaOH 0,08 N	0,2391	AGUAJE ACUOSO + NaOH 80%	0,3365	0,0947	39,60%
NaOH 0,1 N	0,2841	AGUAJE ACUOSO + NaOH 100%	0,4243	0,1825	64,23%
NaOH 0,12 N	0,3698	AGUAJE ACUOSO + NaOH 120%	0,5506	0,3088	83,50%

Tabla 34. Exactitud del extracto acuoso de cocona por el método de adición de patrón (hidróxido de sodio)

EXTRACTO	HUEVO Nº	PESO (mg)	ABS	COLORANTE CONC (moles)	CONC/mg	CANTIDAD DE COLORANTE ABSORBIDO (nmoles/mg)	PROMEDIO CANTIDAD COLORANTE
COCONA ACUOSO	1	55,8	0,035	$9,857 \times 10^{-7}$	$1,767 \times 10^{-8}$	0,0883	0,0620± 0,0230
	2	57,4	0,021	$5,257 \times 10^{-7}$	$9,159 \times 10^{-9}$	0,0458	
	3	60,3	0,024	$6,243 \times 10^{-7}$	$1,035 \times 10^{-8}$	0,0518	
COCONA ACUOSO + NaOH 80%	1	52,9	0,033	$9,200 \times 10^{-7}$	$1,739 \times 10^{-8}$	0,0870	0,1373 ± 0,0771
	2	61,4	0,042	$1,216 \times 10^{-6}$	$1,980 \times 10^{-8}$	0,0990	
	3	59,6	0,087	$2,694 \times 10^{-6}$	$4,521 \times 10^{-8}$	0,2260	
COCONA ACUOSO + NaOH 100%	1	50,8	0,079	$2,431 \times 10^{-6}$	$4,786 \times 10^{-8}$	0,2393	0,2403± 0,0288
	2	52,4	0,091	$2,826 \times 10^{-6}$	$5,393 \times 10^{-8}$	0,2696	
	3	61,2	0,084	$2,596 \times 10^{-6}$	$4,241 \times 10^{-8}$	0,2121	
COCONA ACUOSO + NaOH 120%	1	62,3	0,125	$3,943 \times 10^{-6}$	$6,329 \times 10^{-8}$	0,3164	0,3380± 0,0187
	2	60,5	0,133	$4,206 \times 10^{-6}$	$6,952 \times 10^{-8}$	0,3476	
	3	58,2	0,129	$4,074 \times 10^{-6}$	$7,000 \times 10^{-8}$	0,3500	

Tabla 35. Cálculo del porcentaje de recuperación del extracto acuoso de cocona por el método de adición de patrón (hidróxido de sodio)

PATRÓN AÑADIDO	PROMEDIO COLORANTE ABSORBIDO	EXTRACTO	PROMEDIO COLORANTE ABSORBIDO	CONCENTRACIONES CORREGIDAS DEL EXTRACTO	PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN (%)
-----	-----	COCONA ACUOSO	0,0620	-----	-----
NaOH 0,08 N	0,2391	COCONA ACUOSO + NaOH 80%	0,1373	0,0754	31,53%
NaOH 0,1 N	0,2841	COCONA ACUOSO + NaOH 100%	0,2403	0,1784	62,79%
NaOH 0,12 N	0,3698	COCONA ACUOSO + NaOH 120%	0,3380	0,2761	74,66%

Tabla 36. Exactitud del extracto acuoso de tumbo por el método de adición de patrón (hidróxido de sodio)

EXTRACTO	HUEVO Nº	PESO (mg)	ABS	COLORANTE CONC (moles)	CONC/mg	CANTIDAD DE COLORANTE ABSORBIDO (nmoles/mg)	PROMEDIO CANTIDAD COLORANTE
TUMBO ACUOSO	1	59,4	0,031	$8,543 \times 10^{-7}$	$1,438 \times 10^{-8}$	0,0719	0,0875± 0,0141
	2	61,2	0,042	$1,216 \times 10^{-6}$	$1,986 \times 10^{-8}$	0,0993	
	3	55,8	0,036	$1,019 \times 10^{-6}$	$1,825 \times 10^{-8}$	0,0913	
TUMBO ACUOSO + NaOH 80%	1	59,7	0,051	$1,511 \times 10^{-6}$	$2,532 \times 10^{-8}$	0,1266	0,1206± 0,0093
	2	58,3	0,044	$1,281 \times 10^{-6}$	$2,198 \times 10^{-8}$	0,1099	
	3	61,6	0,052	$1,544 \times 10^{-6}$	$2,507 \times 10^{-8}$	0,1254	
TUMBO ACUOSO + NaOH 100%	1	60,3	0,093	$2,891 \times 10^{-6}$	$4,795 \times 10^{-8}$	0,2398	0,2473± 0,0092
	2	62,5	0,098	$3,056 \times 10^{-6}$	$4,889 \times 10^{-8}$	0,2445	
	3	57,4	0,095	$2,957 \times 10^{-6}$	$5,152 \times 10^{-8}$	0,2576	
TUMBO ACUOSO + NaOH 120%	1	52,9	0,117	$3,680 \times 10^{-6}$	$6,956 \times 10^{-8}$	0,3478	0,3246± 0,0202
	2	61,3	0,122	$3,844 \times 10^{-6}$	$6,271 \times 10^{-8}$	0,3136	
	3	64,7	0,128	$4,041 \times 10^{-6}$	$6,246 \times 10^{-8}$	0,3123	

Tabla 37. Cálculo del porcentaje de recuperación del extracto acuoso de tumbo por el método de adición de patrón (hidróxido de sodio)

PATRÓN AÑADIDO	PROMEDIO COLORANTE ABSORBIDO	EXTRACTO	PROMEDIO COLORANTE ABSORBIDO	CONCENTRACIONES CORREGIDAS DEL EXTRACTO	PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN (%)
-----	-----	TUMBO ACUOSO	0,0875	-----	-----
NaOH 0,08 N	0,2391	TUMBO ACUOSO + NaOH 80%	0,1206	0,0331	13,84%
NaOH 0,1 N	0,2841	TUMBO ACUOSO + NaOH 100%	0,2473	0,1598	56,24%
NaOH 0,12 N	0,3698	TUMBO ACUOSO + NaOH 120%	0,3246	0,2371	64,11%